SYNTHESE UND BIOLOGISCHE AKTIVITÄT VERKÜRZTER VARIIERTER INSULIN-B-KETTEN

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
KARL EISELE
aus Stuttgart

1970

SYNTHESE UND BIOLOGISCHE AKTIVITÄT VERKÜRZTER VARIIERTER INSULIN-B-KETTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

KARL EISELE

aus Stuttgart

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	22. Oktober 1970
Dekan:	Professor Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. G. Weitzel
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Dr. W. Frank

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. Günther Weitzel im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Meinem Lehrer danke ich für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung.

Den Herren Dr. U. Weber und Dr. S. Hörnle bin ich für vielfache und wertvolle Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Der mikroanalytischen Abteilung des Instituts unter Leitung von Frau Dr. A.M. Fretzdorff danke ich für die analytischen Bestimmungen.

Frau E. Hofmann danke ich für die Hilfe bei der Messung der biologischen Aktivitäten im Mäusefalltest.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	3
a) Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe	3
b) Allgemeines	3
1. Schmelzpunkte	3
2. Analysen	4
3. Dünnschichtchromatographie	4
4. Elektrophorese	4
c) Darstellung von t-BOC-Azid	4
d) Darstellung der geschützten Aminosäuren	5
1. N-t-BOC-L-Alanin	5
2. N-t-BOC-L-Alanin-ONP	6
3. N^{α}-Z-L-Arginin	6
4. N^{G}-Tosyl-L-Arginin	7
5. N^{α}-t-BOC-N^{G}-Tos-L-Arginin	8
6. N-t-BOC-L-Asparagin	9
7. N-t-BOC-L-Asparagin-ONP	10
8. S-Benzyl-L-Cystein	11
9. N-t-BOC-S-Bzl-L-Cystein	11
10. N-t-BOC-S-Bzl-L-Cystein-ONP	12
11. S-Äthylmercapto-L-Cystein	12
α) Perbenzoesäure aus Benzoylperoxid	12
ß) Diäthylthiosulfinat	13
γ) S-Äthylmercapto-L-Cystein	14
12. N-t-BOC-SÄM-L-Cystein	14
α) N-t-BOC-SÄM-L-Cystein-DCHA-Salz	14
ß) N-t-BOC-SÄM-L-Cystein	15
13. L-Glutaminsäure-γ-Benzylester	15
14. N-t-BOC-L-Glutaminsäure-γ-Benzylester	16

Seite

15. N-t-BOC-L-Glu-γ-O-Bzl-α-ONP 18
16. N-t-BOC-L-Glutamin 18
17. N-t-BOC-L-Glutamin-ONP 19
18. N-t-BOC-Glycin 20
19. N-t-BOC-Glycin-ONP 20
20. N^{i}-Bzl-L-Histidin 21
21. N^{α}-t-BOC-N^{i}-Bzl-L-Histidin 21
22. N^{α}-t-BOC-L-Histidin 22
23. N-t-BOC-L-Leucin x 1/2 H_2O 22
24. N-t-BOC-L-Leucin-ONP 23
25. N -Z-L-Lysin 24
26. N^{α}-t-BOC-N -Z-L-Lysin 24
27. N-t-BOC-Phenylalanin 26
28. N-t-BOC-L-Phenylalanin-ONP 26
29. N-t-BOC-O-Bzl-L-Serin 27
30. O-Bzl-L-Tyrosin 27
31. N-t-BOC-O-Bzl-L-Tyrosin 28
32. N-t-BOC-O-Bzl-L-Tyrosin-ONP 29
33. N-t-BOC-L-Valin 29

e) Allgemeine Methoden 30

1. Chlormethylierung des Merrifield-Harzes 30
2. Anesterung von N-t-BOC-L-Alanin an das Trägerharz 31
3. Anesterung von N -Z-N^{α}-t-BOC-L-Lysin an das Trägerharz 31
4. Allgemeiner Verlauf der Merrifield-Synthese unter Verwendung von p-Nitrophenylestern 31
5. Allgemeiner Verlauf der Merrifield-Synthese unter Verwendung von DCCI als Kupplungsreagenz 32
6. Allgemeine Methode zur Ablösung des fertigen, geschützten Peptids vom Trägerharz 33
7. Abspaltung des N^{G}-Tos-, N^{i}-Bzl- und des S-Bzl-Restes mit Natrium in flüssigem Ammoniak 34
8. Sulfitolyse der reduzierten Ketten 35
9. Darstellung der nativen Rinderinsulin-A(SSO_3^-)$_4$-Kette aus Rinderinsulin 35

Seite

10. Kombination synthetischer B-Ketten mit nativer A-Kette 36

11. Biologischer Test 37

III. ERGEBNISSE 43

a) Darstellung der verkürzten und variierten Insulin-B-Ketten mit der Merrifield-Synthesetechnik 43

1. Kette II 43

2. Kette III 44

3. Kette IV 44

4. Kette V 45

5. Kette VI 45

6. Kette VII 46

7. Kette VIII 46

8. Kette IX 47

9. Kette X 47

10. Kette XI 47

11. Kette XII 48

12. Kette XIII 48

13. Kette XIV 48

14. Kette XV 49

15. Kette XVI 49

16. Kette XVII 50

17. Kette XVIII 50

18. Kette XIX 50

19. Kette XX 51

b) Reinigung der verkürzten und variierten Insulin-B$(SSO_3^-)_2$-Kette 51

1. Auswahl der zu reinigenden B$(SSO_3^-)_2$-Ketten 51

2. Reinigung an DOWEX 50 x 2 52

3. Reinigung an SE-Sephadex C 25 53

c) Reinigung der aus den gereinigten B-Ketten dargestellten Hybridinsuline 56

1. Reinigung der Rohkombinate an Sephadex G-50 superfine 56

Seite

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 58

V. ZUSAMMENFASSUNG 69

VI. LITERATURVERZEICHNIS 70

LEBENSLAUF 74

ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen für Aminosäuren und Schutzgruppen nach IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Hoppe-Seyler's Zeitschr. für Physiologische Chemie, 348, 256 - 261 (1967).

Ala	= L-Alanin
Arg	= L-Arginin
Asn	= L-Asparagin
Cys	= L-Cystein
Gln	= L-Glutamin
Glu	= L-Glutaminsäure
Gly	= Glycin
His	= L-Histidin
Leu	= L-Leucin
Lys	= L-Lysin

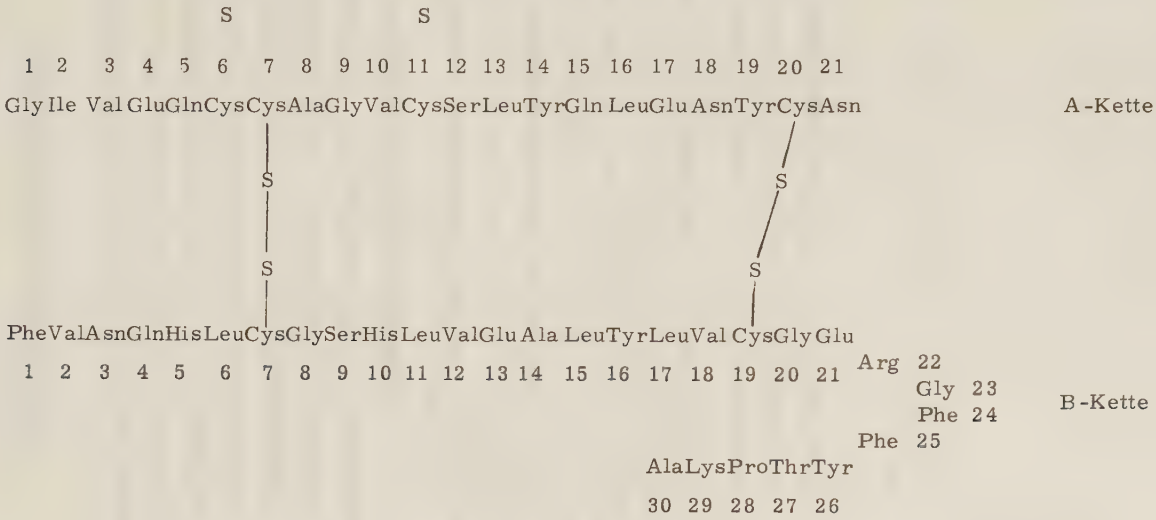
Phe	= L-Phenylalanin
Pro	= L-Prolin
Ser	= L-Serin
Thr	= L-Threonin
Tyr	= L-Tyrosin
Val	= L-Valin
Z	= Carbobenzoxy
Cbo-Cl	= Carbobenzoxychlorid
t-BOC	= tertiär-Butyloxycarbonyl
ONP	= p-Nitrophenylester
N^{i}-Bzl	= Imidazolstickstoff mit Benzylrest geschützt
O-Bzl	= Benzylester bzw. Benzyläther
S-Bzl	= S-Benzyl
SÄM	= S-Äthylmercapto
Tos	= Tosylrest
DCCI	= Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	= Dimethylformamid
TÄA	= Triäthylamin
TFA	= Trifluoressigsäure
DCHA	= Dicyclohexylamin
THF	= Tetrahydrofuran
Tris	= Tris(hydroxymethylamino)-methan oder 2-Amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propandiol

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Entfernt man im Insulin jeweils eine der vier endständigen Aminosäuren, so wird dadurch die biologische Aktivität in verschiedener Weise beeinflußt. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit, im Sommer 1968, lagen hierzu folgende Befunde vor: das Fehlen von Glycin A1 [1] oder von Asparagin A21 [2, 3] führt zum fast vollständigen Wirkungsverlust des Hormons. Dagegen scheint das Fehlen von Phenylalanin B1 [4] oder von Alanin B30 [5, 6] (Rinderinsulin) die Aktivität des Hormons nicht zu beeinträchtigen.

Nach diesen Befunden haben Versuche zur Verkürzung der A-Kette unter Aufrechterhaltung der Aktivität keine Erfolgsaussichten, für die B-Kette dagegen erhebt sich die Frage, ob nach Wegnahme der beiden endständigen Aminosäuren (s. o.) noch weitere Verkürzungen möglich sind, ohne daß die Aktivität verloren geht. Hierzu ist für den N-Terminus bereits nachgewiesen [4], daß neben Phenylalanin B1 auch Valin B2 ohne Aktivitätsverminderung entfallen kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Insulin-B-Kette so lange an beiden Enden zu verkürzen, bis merklicher und schließlich absoluter Aktivitätsverlust eintritt.



Formel des Schafinsulins

II. MATERIAL UND METHODEN

a) Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe

L-Aminosäuren wurden von den Firmen Ajinomoto und Co., E. Merck AG und Serva bezogen.
T-BOC-Hydrazid, E. Merck AG
DCCI zur Synthese, E. Merck AG
p-Nitrophenol techn. Höchst (das technische Produkt wurde durch zweimaliges Umkristallisieren aus 5%iger HCl unter Zusatz von Aktivkohle gereinigt).
Merrifield-Harz, Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Methylenchlorid, Höchst
DMF, BASF
Triäthylamin, BASF
Trifluoressigsäure, E. Merck AG
Dialysierschlauch, Serva (Visking-Dialyseschlauch 18/32)
2-Mercaptoäthanol puriss. p.a., Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Dowex 50 W x 2, Serva
Sephadex Gele (G 25 coarse, G 50 superfine), Pharmacia, Uppsala, Schweden.
SE-Sephadex C 25, Pharmacia, Uppsala, Schweden.
Kristallines Rinderinsulin, Höchst (27 I.E./mg Zinkgehalt ca. 0,3 %).

Alle Lösungsmittel waren absolut, Die Absolutierung erfolgte nach den üblichen in der Literatur beschriebenen Verfahren.

b) Allgemeines

1. Schmelzpunkte

Alle Schmelz- oder Zersetzungspunkte sind nicht korrigiert und wurden mit dem Apparat nach Tottoli der Firma Büchi (Schweiz) ermittelt.

2. Analysen

Die Analysen wurden im Physiologisch-chemischen Institut der Universität unter der Leitung von Frau Dr. A.M. Fretzdorff ausgeführt.

Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach der Methode von DUMAS. Die Schwefelbestimmung erfolgte nach SCHÖNINGER durch Veraschung, die Sulfatbestimmung durch Leitfähigkeitsmessung nach PFUNDT.

Die optischen Aktivitäten wurden mit einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter LEP A 2 der Firma Carl Zeiss gemessen.

Die Aminosäureanalysen wurden in einem Unichrom Amino Acid Analyzer der Firma Beckman Instruments GmbH München durchgeführt. Die Peptide wurden im Einschlußrohr unter Stickstoff mit 6n HCl/Eisessig 24 - 30 h bei 110 ^{o}C hydrolysiert.

3. Dünnschichtchromatographie

Es wurden Fertigfolien mit Fluorescenzzusatz MN-Polygram der Firma Macherey-Nagel und Co., Düren, verwendet. Das Sorptionsmittel war Kieselgel S-HR/UV_{254}. Entwickelt wurde mit Ninhydrin-Reagenz.

4. Elektrophorese

Das Laufmittel war 1 % Essigsäure, 1,5 % Ameisensäure, 4m Harnstoff-Puffer pH 1,8. Das Papier stammte von der Firma Schleicher und Schüll. Laufzeit 12 h, angelegte Spannung 10 V/cm, Färbung mit Paulys Reagenz.

c) Darstellung von t-BOC-Azid [8]

300 g t-BOC-Hydrazid werden in einem Gemisch von 264 g Eisessig und 175 ml Wasser gelöst, das Gemisch auf 5 ^{o}C in einer Eis-/NaCl-Mischung abgekühlt und eine Lösung von 172,2 g $NaNO_2$ in 200 ml Wasser zugetropft, und zwar so schnell, daß die Temperatur zwi-

schen 5 °C und 10 °C bleibt. Nach beendeter Zugabe der Natriumnitritlösung wird noch 1 h im Eisbad und 2 h bei R.T. gerührt.
Das Reaktionsgemisch wird in einen Scheidetrichter umgefüllt, 375 ml Wasser zugegeben und die gelbliche Azidphase abgetrennt. Bei schlechter Trennung der Schichten gibt man etwas Äther zu. Die wässrige Phase wird noch 3 mal mit Äther extrahiert (jeweils ca. 120 ml Äther). Die vereinigten Ätherextrakte werden mit 150 ml Wasser, 4 mal mit 120 ml 1n $NaHCO_3$-Lösung, 200 ml 0,5 n $NaHCO_3$-Lösung und noch zweimal mit 200 ml Wasser ausgeschüttelt. Die Ätherphase wird über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel bei 4 °C im Wasserstrahlvakuum abgezogen.

Ausbeute: 290 - 318 g $C_5H_9N_3O_2$ MG: 143,15

d) Darstellung der geschützten Aminosäuren

1. N-t-BOC-L-Alanin [9]

44,55 g (500 mMol) L-Alanin werden in 100 ml Wasser, 100 ml Dioxan und 140 ml (550 mMol) einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan suspendiert und am Autotitrator bei pH 10,1 mit 4n NaOH titriert. Die entstandene klare Lösung wird bei 35 °C i. V. am Rotationsverdampfer auf etwa 100 ml eingeengt, dann wird mit Aqua dest. auf ca. 400 ml aufgefüllt und die Lösung 3 mal mit 100 ml Äther extrahiert.
Die wässrige Lösung säuert man bei 0 °C mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 an. Das zunächst ölig anfallende N-t-BOC-L-Ala wird nach einiger Zeit fest. Es empfiehlt sich nicht, das feste N-t-BOC-L-Ala abzusaugen und mit Wasser zu waschen, da das N-t-BOC-L-Ala sehr gut wasserlöslich ist. Das Reaktionsgemisch wird daher in einen Scheidetrichter überführt und 4 mal mit 200 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden mit gesättigter NaCl-Lösung 6 mal gewaschen. (Da N-t-BOC-L-Ala selbst etwa pH 2 - 3 in wässri-

ger Lösung hat, bleibt die NaCl-Lösung immer sauer. Aus diesem Grunde ist das Waschen bis zur neutralen Reaktion, wie es in den Vorschriften heißt, nicht möglich.) Die gewaschenen Essigesterphasen werden über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und i. V. bei 36 °C eingedampft. Das zurückbleibende Öl löst man in 150 - 200 ml Diäthyläther und bringt das N-t-BOC-L-Ala durch Zugabe von Petroläther zur Kristallisation.

Ausbeute: 170 g = 90 % d. Th. $C_8H_{15}NO_4$ MG: 189,2

$N_{ber.}$ = 7,4 % $N_{gef.}$ = 7,3 % $Fp_{Lit.}$ = 80 - 81 °C $Fp_{gef.}$ = 81 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 25,2 (c = 1 Eisessig) Lit.

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 25,4 (c = 1 Eisessig) gef.

2. N-t-BOC-L-Alanin-ONP

37,85 g (200 mMol) t-BOC-L-Alanin und 33,4 g (240 mMol) p-Nitrophenol werden in 150 ml Essigester gelöst und auf 0 °C abgekühlt, dann werden 45,4 g (220 mMol) DCCI gelöst in 100 ml Essigester langsam unter Rühren zugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei 0 °C und 2 h bei R.T. wird der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, mehrmals mit Essigester gewaschen und die vereinigten Essigesterfiltrate i. V. eingedampft. Der Rückstand wird aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.
(Zur Reinigung wurden sowohl t-BOC-L-Ala als auch N-t-BOC-Ala-ONP in der Kälte ohne Schädigung und Verlust mit Aktivkohle behandelt.)

Ausbeute: 41 g = 66 % d. Th. $C_{14}H_{17}N_2O_6$ MG: 310,3

$N_{ber.}$ = 9,02 % $N_{gef.}$ = 9 % $Fp_{gef.}$ = 81 - 81,5 °C

3. N^{α}-Z-L-Arginin [10]

Zu einer Lösung von 63 g $NaHCO_3$ in 250 ml Wasser in einem 1 l-Be-

cherglas werden 42,2 g L-Arginin x HCl hinzugegeben und stark gerührt (bei R.T.). Zu dieser Lösung werden 37,4 g Cbo-Cl in einem Zeitraum von 30 min. hinzugetropft. Die Lösung wird nach beendeter Zugabe noch 1 h weitergerührt und danach der pH mit konz. NH_3 auf 8,5 gebracht und dann 2 h bei 4 °C gehalten. Das kristalline Produkt wurde abfiltriert und aus siedendem Wasser, dem man wenige Tropfen Ammoniak zusetzt, umkristallisiert.

Ausbeute: 58 g = 95 % d. Th. $C_{14}H_{20}N_4O_4$ MG: 308

$N_{ber.}$ = 18,2 % $N_{gef.}$ = 18,1 % $Fp_{Lit.}$ = 175 °C $Fp_{gef.}$ = 175 °C

4. N^G-Tosyl-L-Arginin [11]

100 g (324 mMol) N^α-Z-L-Arg werden unter Erwärmen und Rühren in 400 ml Wasser und 1600 ml Aceton gelöst. Dann wird die klare Lösung auf 0 °C gekühlt und am pH-Stat mit 4n NaOH bei pH 11,4 titriert (4 - 5 h). Danach werden 136,8 g (736 mMol) p-Tosylchlorid in 240 ml Aceton tropfenweise im Zeitraum von 1 h hinzugegeben. Unter weiterem starkem Rühren wird die Lösung mit 4n NaOH am pH-Stat auf pH 11,4 gehalten. Im Verlaufe der Reaktion trübt sich die Lösung durch ausfallendes Produkt. Wenn keine NaOH mehr aufgenommen wird, wird die Lösung mit 1n HCl auf pH 7,0 eingestellt. Das Aceton wird gründlich i. V. bei R.T. abgezogen. 800 ml Wasser werden zur restlichen Lösung hinzugegeben und diese Lösung 6 mal mit je 200 ml Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird auf 0 °C gekühlt und mit 6n HCl auf pH 3 gebracht. Ein dickes Öl scheidet sich ab. Der Überstand wird abdekandiert und mit NaCl gesättigt. Diese gesättigte Lösung wird 3 mal mit 200 ml Essigester extrahiert. Die oben beschriebene, ölige Phase wird mit dem Essigesterextrakt vereinigt und durch Zugabe von weiterem Essigester in Lösung gebracht. Dann wird wiederholt mit kalter 0,1n HCl solange gewaschen, bis der Sakaguchi-Test negativ ist. Die

organische Phase wird dann mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen, mit wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und i. V. bei R.T. bis zur Trockene eingedampft.
Es werden ca. 200 g dickes, braunstichiges Öl erhalten, das nicht zur Kristallisation zu bringen ist.

$C_{21}H_{26}N_4O_6S$ MG: 462,5

Dieses Öl wird in Methanol gelöst und mit 5 ml Eisessig versetzt. Diese Lösung wird in eine 1 l-Schüttelente eingefüllt und nach Durchleiten von N_2 mit 3 großen Spatelspitzen Pd/Aktivkohle versetzt und hydrogeniert. Wenn kein H_2 mehr aufgenommen wird, filtriert man den Katalysator ab und kocht die klare Lösung ca. 1/2 h mit Aktivkohle. Nach Abfiltrieren der Aktivkohle wird die Lösung auf das doppelte Volumen mit Methanol aufgefüllt und in zwei Portionen nochmals hydrogeniert. Während der Hydrierung müssen noch zweimal je 3 Spatelspitzen voll Katalysator zugegeben werden. (Vorsicht, vor der jeweiligen Zugabe des Katalysators muß das Gefäß mit N_2 durchgespült werden.) Das hydrierte Produkt wird am Rotationsverdampfer vom Methanol befreit und anschließend aus heißem Wasser umkristallisiert. (Das heiße Wasser wird von evtl. ausfallendem Öl abfiltriert.)

Ausbeute: 70 g = 68 % d. Th. $C_{13}H_{20}N_4O_4S$ MG: 328,4

$N_{ber.}$ = 17,1 % $N_{gef.}$ = 17,0 % $Fp_{Lit.}$ = 146 - 150 °C

$S_{ber.}$ = 9,77 % $S_{gef.}$ = 9,69 % $Fp_{gef.}$ = 148 °C

$[\alpha]_D^{23}$ = - 6,1 (c = 1 Methanol) Lit.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 6,2 (c = 1 Methanol) gef.

5. N^{α}-t-BOC-N^{G}-Tos-L-Arginin [11]

70 g (213 mMol) N^{G}-Tos-L-Arg werden in 100 ml Wasser und 100 ml Dioxan suspendiert, mit 60 ml t-BOC-Azid versetzt und am pH-Stat mit 4n NaOH bei pH 9,8 titriert. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung am Rotationsverdampfer i. V. auf ca. 100 ml eingeengt und das

ausgefallene Salz mit ca. 300 ml Wasser wieder in Lösung gebracht und 3 mal mit 150 ml Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird auf 0 °C gekühlt und mit fester Citronensäure auf pH 2,5 - 3,0 gebracht. Das ausfallende, dicke Öl wird in Essigester gelöst und mehrmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Dann wird der Essigesterextrakt über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und mit Aktivkohle verrührt. Abziehen des Essigesters i. V. bei R.T. ergibt ein braunstichiges Öl, das in wenig kochendem Essigester aufgenommen wird. Nach 3 - 4 Tagen tritt Kristallisation ein. (Beim Animpfen beginnt die Kristallisation sofort.)

Ausbeute: 74 g = 67,7 % d. Th. $C_{18}H_{28}N_4O_6S$ MG: 428,5

$N_{ber.}$ = 13,1 % $N_{gef.}$ = 13,0 % $Fp_{Lit.}$ = 98 - 100 °C

$S_{ber.}$ = 7,48 % $S_{gef.}$ = 7,4 % $Fp_{gef.}$ = 97 - 98 °C

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 3,2 (c = 1 Eisessig) Lit.

$[\alpha]_{578}^{24}$ = - 3,3 (c = 1 Eisessig) gef.

6. N-t-BOC-L-Asparagin [12 - 14]

75,1 g (500 mMol) L-Asn x H_2O werden fein zerrieben, dann in 150 ml Wasser und 125 ml Dioxan suspendiert, die Suspension auf pH 9,0 eingestellt und 140 ml (550 mMol) 4m t-BOC-Azid in Dioxan zugegeben. Dann wird unter kräftigem Rühren am pH-Stat mit 4n NaOH titriert. (Der pH kann stufenweise bis auf pH 10,0 erhöht werden.)
Nach beendeter Reaktion wird das Dioxan am Rotationsverdampfer i. V. bei 30 °C abgezogen. Eine zu starke Einengung ist nicht zu empfehlen, da das auskristallisierende Na-Salz nur sehr schlecht wieder in Lösung geht. Nach Zugabe von Wasser wird mit je 100 ml Äther 3 mal ausgeschüttelt, die wässrige Phase im Eisbad mit konz. Citronensäurelösung bis auf pH 2,5 angesäuert und so ein festes Produkt ausgefällt. Dieses ausgefallene t-BOC-L-Asn wird abgesaugt und 2 mal mit eiskaltem Was-

ser gewaschen und getrocknet. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol/ Wasser = 1 : 4.

Diese Lösung darf zur Kristallisation nicht in den Kühlschrank gestellt werden, da sonst unumgesetztes L-Asn mitkristallisiert.

Ausbeute: 79,0 g = 68 % d. Th. $C_9H_{16}N_2O_5$ MG: 232,2

$N_{ber.}$ = 12,05 % $N_{gef.}$ = 11,99 % $Fp_{Lit.}$ = 174 - 176 °C

$Fp_{gef.}$ = 174 - 175 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 8,5 (c = 1 DMF) Lit.

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 8,3 (c = 1 DMF) gef.

7. N-t-BOC-L-Asparagin-ONP [14]

56 g (241 mMol) N-t-BOC-L-Asn und 37,6 g p-Nitrophenol werden in 500 ml THF und 180 ml DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann werden 54,8 g DCCI in 100 ml THF zugegeben und unter Eiskühlung 6 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, mehrmals mit THF nachgewaschen und die vereinigten THF-Fraktionen i. V. bei 30 °C eingedampft. Die zurückbleibende DMF-Lösung wird nochmals filtriert, mit 1/2 l Essigester versetzt und 5 mal mit verdünnter $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt. Nachdem nochmals mit Wasser 3 mal gewaschen worden ist, wird 1 mal mit 10%iger Citronensäure und daran anschließend 2 mal mit Wasser behandelt. Trocknen über wasserfreiem $MgSO_4$ und Abziehen des Essigesters ergibt ein öliges Produkt, das zweimal aus Äthanol umkristallisiert wird.

Ausbeute: 37,8 g = 45 % d. Th. $C_{15}H_{19}N_3O_7$ MG: 353,2

$N_{ber.}$ = 11,9 % $N_{gef.}$ = 11,75 % $Fp_{Lit.}$ = 148 - 149 °C

$Fp_{gef.}$ = 147 - 148 °C

$[\alpha]_D^{26}$ = - 45,3 (c = 1 DMF) Lit.

$[\alpha]_D^{22}$ = - 43,8 (c = 1 DMF) gef.

8. S-Benzyl-L-Cystein [15]

72,6 g (100 mMol) L-Cys werden in einem Gemisch von 270 ml 2n NaOH und 450 ml Äthanol gelöst, zu dieser Lösung 113 g Benzylbromid unter kräftigem Rühren im Verlauf von 2 h zugetropft, noch 2 h gerührt und über Nacht bei 0 °C belassen. Der anfallende dicke, weiße Brei wird abgesaugt, mit Wasser und Äther gewaschen und das noch feuchte Produkt aus etwa 4 - 5 l kochendem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 100 g = 79 % d. Th. $C_{10}H_{13}NO_2S$ MG: 211,4

$Fp_{Lit.}$ = 213 °C $Fp_{gef.}$ = 212 °C

9. N-t-BOC-S-Bzl-L-Cystein [9]

105,7 g (500 mMol) S-Bzl-L-Cys werden in 300 ml Dioxan und 300 ml Wasser suspendiert, 140 ml (550 mMol) 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und mit 4n NaOH bei pH 9,6 am Autotitrator titriert. Während der Reaktion wird kräftig gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch i. V. bei 30 °C eingedampft, mit 500 ml Wasser aufgenommen und 3 mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend langsam in eine ausreichende Menge gut gekühlte, kalt gesättigte Citronensäurelösung getropft. Hierbei fällt das N-t-BOC-S-Bzl-L-Cys aus. Man vermeidet durch das Eintropfen der Lösung in die Citronensäure, daß das ausfallende Produkt noch Natriumsalz enthält. Das erhaltene, kristalline N-t-BOC-S-Bzl-L-Cys wird abgesaugt, gut mit dest. Wasser gewaschen und in einen Scheidetrichter gefüllt. Das Produkt wird mit Essigester so lange geschüttelt, bis sich alles gelöst hat. Die Essigesterphase wird dann ca. 6 mal mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. (Es empfiehlt sich, zuvor nochmals mit 100 ml halbkonz. Citronensäurelösung auszuschütteln.) Die Essigesterphase wird über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zugabe von Aktivkohle getrocknet und i. V. eingedampft. Der ölige Rückstand wird mit Äther aufgenommen

und so viel Petroläther zugegeben, bis ein starker Niederschlag entsteht. Dieser wird durch Erwärmen, evtl. unter Zugabe von wenig Äther, wieder in Lösung gebracht und langsam, unter Animpfen mit ein paar Impfkristallen, abkühlen gelassen.

Ausbeute: 124,6 g = 80 % d. Th. $C_{15}H_{21}NO_4S$ MG: 311,2

$N_{ber.}$ = 4,59 % $N_{gef.}$ = 4,6 % $Fp_{Lit.}$ = 63 - 65 °C

$S_{ber.}$ = 10,3 % $S_{gef.}$ = 10,4 % $Fp_{gef.}$ = 86 - 87 °C

$[\alpha]_{578}^{17-25}$ = - 45,3 (c = 1 Eisessig)

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 45,5 (c = 1 Eisessig)

10. N-t-BOC-S-Bzl-L-Cystein-ONP

31,2 g (100 mMol) N-t-BOC-S-Bzl-L-Cys und 16,7 g p-Nitrophenol werden in 150 ml Essigester gelöst und auf 0 °C abgekühlt, dann werden 27,7 g DCCI in wenig Essigester gelöst zugegeben und 2 h bei 0 °C und 2 h bei R.T. gerührt. Der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, mit Essigester gewaschen und Filtrat + Waschflüssigkeit vereinigt und i. V. bei 30 °C eingedampft. Umkristallisation erfolgt aus Äthanol und wenig Petroläther.

Ausbeute: 34,6 g = 80 % d. Th. $C_{21}H_{24}N_4O_6S$ MG: 432,5

$Fp_{gef.}$ = 95 - 96 °C

11. S-Äthylmercapto-L-Cystein [16 - 18]

α) Perbenzoesäure aus Benzoylperoxid

10,4 g (220 mMol) Natrium werden in 200 ml absolutem Methanol gelöst und auf - 5 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung tropft man unter Rühren und Kühlung mit Eis/Kochsalz langsam eine Lösung von

100 g trockenem Benzoylperoxid in 250 ml Chloroform so zu, daß die Temperatur nicht über 0 °C ansteigt. Nach beendeter Reaktion rührt man noch 5 min. und gibt die mehr oder weniger dickflüssige Suspension in einen Scheidetrichter, in dem sich 700 ml Wasser mit Eisstückchen befinden. Das Na-Perbenzoat wird in die wässrige Phase geschüttelt und die Chloroformphase noch 2 mal mit 250 ml Eiswasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Auszüge werden dann zweimal mit je 150 ml Chloroform extrahiert und im Eisbad mit 450 ml 1n H_2SO_4 angesäuert. Die ausgefallene Perbenzoesäure wird nun mit 200 ml Chloroform extrahiert, die wässrige Phase noch 3 mal mit je 120 ml Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten Chloroformauszüge 3 mal mit 40 ml Wasser extrahiert und anschließend über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Die getrocknete Lösung wird filtriert und i. V. bei 20 °C Badtemperatur am Rotationsverdampfer auf etwa 250 ml eingeengt.

ß) Diäthylthiosulfinat

In einen 2 l-Dreihalskolben gibt man 40 g (320 mMol) Diäthyldisulfid und 250 ml Chloroform und kühlt auf 0 °C ab. Unter starkem Rühren und Kühlen im Eis-/Kochsalz-Bad wird die oben erhaltene Perbenzoesäurelösung zugetropft, dabei soll die Temperatur ca. 0 °C betragen. Nach beendeter Zugabe rührt man noch 30 min. bei 0 °C und eine Stunde bei R. T. und gibt dann unter Rühren 200 ml 1n $NaHCO_3$-Lösung zu, um nicht umgesetzte Perbenzoesäure zu entfernen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter gegeben, die wässrige Phase abgetrennt und die Chloroformphase 4 mal mit je 70 ml 4 - 5%iger $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Auszüge extrahiert man dann 3 mal mit je 70 ml Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen werden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, wenn nötig mit etwas Aktivkohle behandelt, filtriert und das Lösungsmittel so gut wie möglich i. V. bei 30 °C abgedampft. Die Ausbeute an Diäthylthiosulfinat ist zwischen 40 - 50 g (leicht gelbliches Öl).

γ) S-Äthylmercapto-L-Cystein

24,3 g (200 mMol) L-Cystein werden in einer äquivalenten Menge 1 n HCl gelöst und das oben erhaltene Diäthylthiosulfinat mit etwas Äthanol möglichst quantitativ in die L-Cysteinhydrochloridlösung eingespült. Dann wird unter kräftigem Rühren mit 2n NaOH der pH des Reaktionsgemisches auf 6,5 eingestellt (Vorsicht, ein höherer pH kann zu Disulfidaustausch führen!), wobei das S-Äthylmercapto-L-Cystein ausfällt. Man kühlt das Reaktionsgemisch auf 0 °C ab und saugt das ausgefallene Produkt ab. Man wäscht mit Äthanol und Äther nach und kristallisiert aus ca. 1 l kochendem Wasser um.

Ausbeute: 20 - 30 g $C_5H_{11}NO_2S_2$ MG: 181

$N_{ber.}$ = 7,75 % $N_{gef.}$ = 7,68 %

$Fp_{gef.}$ = 205 - 208 °C (u. Zers.)

$[\alpha]_D^{15}$ = - 147,2 (c = 0,3 1n HCl) gef.

12. N-t-BOC-SÄM-L-Cystein [9 + 19)]

α) N-t-BOC-SÄM-L-Cystein-DCHA-Salz

Eine Mischung von 18,1 g (100 mMol) SÄM-L-Cys, 35 ml (250 mMol) Triäthylamin (TÄA), 37,5 ml (150 mMol) 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan, 200 ml Wasser und 300 ml Dioxan werden über Nacht bei 45 °C gerührt. Danach wird das Dioxan i. V. abgezogen und die wässrige Phase mehrmals mit Äther extrahiert. Dann wird mit Citronensäure bei 0 °C auf pH 2,5 angesäuert. Das sich abscheidende Öl wird mit Essigester extrahiert. Die Essigesterphase wird mit gesättigter NaCl-Lösung säurefrei gewaschen, mit wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der braune Rückstand wird in Äther aufgenommen und in der Kälte mit 100 mMol Dicyclohexylamin versetzt, wobei allmählich das DCHA-Salz auskristallisiert. Nach 12 h bei 0 °C wird abfiltriert und aus Aceton umkristallisiert. Das Produkt enthält noch etwas t-BOC-

Cystin, das auf dieser Stufe nicht abgetrennt werden kann.

Ausbeute: 36,8 g = 80 % d. Th. $(C_{12}H_{24}N)^{+}(C_{10}H_{18}NO_4S_2)^{-}$

$N_{ber.}$ = 6,05 % $N_{gef.}$ = 6,0 % MG: 462,7

Fp = 137 - 139 °C

ß) N-t-BOC-SÄM-L-Cystein

23,1 g (50 mMol) des obigen Dicyclohexylammoniumsalzes werden im Scheidetrichter mit 200 ml Essigester und 100 ml kalt gesättigter Citronensäure versetzt und kräftig geschüttelt.
Nachdem sich alles gelöst hat, wird die Essigesterphase abgetrennt, mit halbkonz. NaCl-Lösung säurefrei gewaschen, getrocknet (mit wasserfreiem $MgSO_4$) und i. V. eingeengt. Der ölige Rückstand enthält noch t-BOC-Cystin. Um dieses vom N-t-BOC-SÄM-L-Cys abzutrennen, wird das Öl in wenig Essigester gelöst, mit Petroläther bis zur Trübung versetzt und auf 0 °C gekühlt. Am Kolbenrand setzt sich bald eine ölige Schicht ab, die allmählich durchkristallisiert. Beträgt die Menge des abgeschiedenen Öls ungefähr 3 - 5 g, so wird schnell über eine dünne Schicht Aktivkohle abfiltriert. Aus dem Filtrat kristallisiert nach weiterem Kühlen das N-t-BOC-SÄM-L-Cys in weißen Blättchen aus. Aus der Mutterlauge können evtl. noch weitere 1 - 2 g des Produkts gewonnen werden. Die Menge des vorabgeschiedenen Öles beträgt ca. 4 - 4,5 g.

Ausbeute: 6,9 g = 50 % $C_{10}H_{19}NO_4S_2$ MG: 281,4

$N_{ber.}$ = 4,98 % $N_{gef.}$ = 5,0 % Fp = 72 °C

$S_{ber.}$ = 22,8 % $S_{gef.}$ = 22,6 %

$[\alpha]_D^{20}$ = - 104 (c = 2 Methanol)

13. L-Glutaminsäure-γ-Benzylester [20]

Zu 500 ml Äther werden unter Eiskühlung 50 ml konz. H_2SO_4 p.a. lang-

sam zugetropft und nach beendeter Zugabe unter Rühren so lange weitergekühlt, bis die Temperatur auf 0 °C bleibt. Dann werden 500 ml frisch destillierter, aldehydfreier Benzylalkohol zugefügt und der Äther i. V. abgezogen. Dann werden 73,5 g (500 mMol) L-Glutaminsäure in kleinen Portionen zugesetzt und das Gemisch, das bald eine klare Lösung ergibt, 20 h bei R.T. weitergerührt. Nach 20 h gibt man unter Eiskühlung 1 l 96%iges Äthanol und 250 ml destilliertes Pyridin zu, dabei kristallisiert der L-Glu-γ-Bzl-Ester spontan aus. Man beläßt nun etwa 20 h bei - 10 °C, saugt dann den ausgefallenen Ester schnell ab, wäscht mit wenig kaltem Wasser nach und kristallisiert mehrmals aus kochendem Wasser um.

Ausbeute: 82 g = 75 % d. Th. $C_{12}H_{15}NO_4$ MG: 237,3

$N_{ber.}$ = 6,18 % $N_{gef.}$ = 6,2 % $Fp_{Lit.}$ = 186 - 189 °C

$Fp_{gef.}$ = 185 - 186 °C

14. N-t-BOC-L-Glutaminsäure-γ-Benzylester [9]

118,5 g (500 mMol) L-Glu-γ-Bzl-Ester werden in 400 ml Wasser und 400 ml Dioxan suspendiert, 140 ml (550 mMol) einer 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und mit 4n NaOH bei pH 9,5 titriert. Es werden nicht, wie zu erwarten wäre, 250 ml 4n NaOH verbracht, sondern nur 200 - 220 ml. Eine Verlängerung der Reaktionszeit bzw. eine Erhöhung des pH-Wertes bringt lediglich eine Verschlechterung der Ausbeute, auch bei Erniedrigung des pH-Wertes läuft die Reaktion sehr schlecht ab.

Das erhaltene Produkt wird i. V. bei 30 °C auf etwa 200 ml eingeengt, sollte dabei das Na-Salz ausfallen, so bringt man es durch Zugabe von Wasser wieder in Lösung und extrahiert die wässrige Lösung 3 mal mit Äther. Die wässrige Phase wird dann unter Eiskühlung mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert und das ausgefallene Öl mit Essigester extrahiert. Die wässrige Phase wird noch 3 mal mit 150 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterauszüge werden mit gesättigter NaCl-Lösung 8 mal gewaschen und über wasserfreiem $MgSO_4$ und Aktivkohle getrocknet. Man filtriert ab und dampft das Filtrat i. V. ein.

Es verbleibt ein farbloses Öl, das ohne weitere Reinigung zur Darstellung des N-t-BOC-L-Glu-γ-Bzl-α-ONP-Diesters verwendet werden kann. Zur Reinigung des N-t-BOC-L-Glu-γ-Bzl-Esters muß noch das unten beschriebene DCHA-Salz gemacht werden.

Ausbeute: ca. 100 g öliges Produkt $C_{17}H_{23}NO_6$ MG: 237,5

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 9,0 (c = 1 Methanol) gef.

Darstellung des N-t-BOC-L-Glutaminsäure-γ-O-Bzl-DCHA-Salzes

90 g (ca. 270 mMol) N-t-BOC-L-Glu-γ-O-Bzl werden in 250 ml Äther gelöst und unter Eiskühlung 58,5 g (324 mMol) Dicyclohexylamin zugegeben. Bei Zugabe von Petroläther und Kratzen mit einem Glasstab kristallisiert das DCHA-Salz sehr schnell aus. Man beläßt über Nacht bei 0 °C, saugt das Rohprodukt gut ab und wäscht mit Petroläther nach. Umkristallisiert wird aus Aceton, dem wenig Äther zugefügt wurde.

Ausbeute: 114,5 g = 80 % d. Th. $(C_{12}H_{24}N)^+(C_{17}H_{22}NO_6)^-$

$N_{ber.}$ = 5,4 % $N_{gef.}$ = 5,29 % MG: 518,7

$Fp_{Lit.}$ = 140 - 142 °C

$Fp_{gef.}$ = 138 - 139 °C

Freisetzung von N-t-BOC-L-Glu-γ-O-Bzl aus dem DCHA-Salz

114,5 g N-t-BOC-L-Glu-γ-O-Bzl-DCHA-Salz werden in einem 2 l Scheidetrichter in 1 l Essigester suspendiert. Dann werden 500 ml kalt gesättigte Citronensäurelösung zugegeben und so lange geschüttelt, bis zwei klare Phasen entstanden sind. Die wässrige Phase wird dann abgetrennt und noch zweimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen werden mit verdünnter Citronensäurelösung einmal und mit konz. NaCl-Lösung 8 - 10 mal gewaschen. Die Essigesterphase

wird danach über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zugabe von Aktivkohle getrocknet und i. V. bei 30 °C eingedampft. Aus diesem farblosen, öligen Produkt wurde mit Methylenchlorid eine 1m Lösung hergestellt, die als solche bei der Synthese eingesetzt wurde.

Ausbeute: ca. 100 %

15. N-t-BOC-L-Glu-γ-O-Bzl-α-ONP

33,8 g (100 mMol) N-t-Glu-γ-O-Bzl und 16,7 g p-Nitrophenol werden in 150 ml Essigester gelöst und auf - 10 °C abgekühlt. Dann werden 20,6 g (100 mMol) DCCI in Essigester zugegeben und bei - 10 °C 2 h gerührt. Danach wird noch 2 h bei R.T. weitergerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, mit Essigester gut gewaschen und die vereinigten Filtrate i. V. eingedampft. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol.

Ausbeute: 37 g = 80 % d. Th. $C_{23}H_{26}N_2O_8$ MG: 458,6

$N_{ber.}$ = 6,12 % $N_{gef.}$ = 6,08 % $Fp_{gef.}$ = 119 °C

16. N-t-BOC-L-Glutamin [9)]

73,1 g (500 mMol) L-Glutamin werden in einem Gemisch von 200 ml Wasser und 200 ml Dioxan suspendiert, es werden 150 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und das Gemisch am Autotitrator bei pH 10,3 mit 4n NaOH titriert. Die Reaktion ist nach ca. 24 h beendet. Das Reaktionsgemisch wird i. V. bis fast zur Trockene eingedampft, wieder mit Wasser gelöst und mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert. Dann wird die Lösung mit NaCl kalt gesättigt und 10 mal mit 150 ml Essigester extrahiert. (Es muß deshalb so oft extrahiert werden, weil sich N-t-BOC-L-Gln sehr gut in Wasser löst.) Die vereinigten Essigesterphasen werden mit wenig heiß gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ und Aktivkohle getrocknet, abfiltriert und i. V. eingedampft. Der Rückstand wird in 250 ml

Essigester unter Erwärmen gelöst und bei 0 °C kristallisiert. Aus der Mutterlauge kann man durch langsames Einengen weiteres N-t-BOC-L-Gln gewinnen.

Ausbeute: 84 g = 70 % d. Th. $C_{10}H_{18}N_2O_5$ MG: 246,3

$N_{ber.}$ = 11,38 % $N_{gef.}$ = 11,47 % $Fp_{Lit.}$ = 116 - 118 °C

$Fp_{gef.}$ = 115 - 116 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 2,9 (c = 1 EtOH) Lit.

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 3,0 (c = 1 EtOH) gef.

17. N-t-BOC-L-Glutamin-ONP [21)]

49,3 g (200 mMol) N-t-BOC-L-Gln und 30,6 g (220 mMol) p-Nitrophenol werden in 150 ml absolutem THF gelöst, auf - 20 °C abgekühlt und anschließend mit genau 41,2 g DCCI in Wenig THF langsam versetzt. Man rührt noch 5 h im Eis-/Kochsalzbad und läßt dann über Nacht darin weiterrühren, wobei dann durch das Auftauen des Bades eine ganz allmähliche Erwärmung eintritt. Nach diesen ca. 20 h wird das Reaktionsgemisch ganz vorsichtig unter Rühren auf 30 - 40 °C erwärmt, um den mit dem Dicyclohexylharnstoff ausgefallenen Ester wieder in Lösung zu bringen. Der Harnstoff wird abgesaugt und mehrfach mit heißem THF gewaschen. Das Filtrat und die Waschflüssigkeiten werden bei 20 °C i. V. eingedampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Falls hierbei eine violette Färbung auftritt, empfiehlt sich eine Filtration über Aktivkohle.

Ausbeute: 37 g = 50 % d. Th. $C_{16}H_{21}N_3O_7$ MG: 367,4

$N_{ber.}$ = 11,43 % $N_{gef.}$ = 11,4 % $Fp_{Lit.}$ = 140 - 146 °C

$[\alpha]_D^{22}$ = - 31 (c = 1 Essigester) Lit.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 31,3 (c = 1 Essigester) gef.

18. N-t-BOC-Glycin [9]

37, 6 g (500 mMol) Glycin werden in 200 ml Wasser und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und mit 4n NaOH bei pH 10, 0 am Autotitrator titriert. Die Reaktion ist nach ca. 7 h beendet. Das Reaktionsgemisch wird i. V. bei 30 °C eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und 3 mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird dann mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert und das sich abscheidende Öl mit Essigester mehrmals extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden mit kalt gesättigter NaCl-Lösung säurefrei gewaschen und mit wasserfreiem $MgSO_4$/Aktivkohle getrocknet. Nach dem Abfiltrieren wird i. V. bei 30 °C die Lösung eingedampft. Umkristallisiert wird aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 80 g = 91 % d. Th. $C_7H_{13}NO_4$ MG: 175, 1

$N_{ber.}$ = 8, 0 % $N_{gef.}$ = 8, 0 % $Fp_{Lit.}$ = 94 °C

$Fp_{gef.}$ = 94 - 95 °C

19. N-t-BOC-Glycin-ONP

35 g (200 mMol) N-t-BOC-Glycin und 30, 6 g (220 mMol) p-Nitrophenol werden in 200 ml Essigester gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dann werden unter Rühren 41, 2 g (200 mMol) DCCI in wenig Essigester gelöst hinzugegeben und 3 h bei 0 °C und 2 h bei R.T. gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt und gut mit Essigester gewaschen. Das Filtrat und die Waschflüssigkeiten werden i. V. eingedampft und der Rückstand aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 50 g = 85 % d. Th. $C_{13}H_{16}N_2O_6$ MG: 296, 3

$N_{ber.}$ = 9, 46 % $N_{gef.}$ = 9, 5 % $Fp_{gef.}$ = 68 - 69 °C

20. N^i-Bzl-L-Histidin [22]

In einen 500 ml Dreihalskolben, in dem sich 27,25 g (130 mMol) L-Histidin x HCl x H_2O befinden, kondensiert man unter Kühlung (Aceton/Trockeneis) etwa 200 ml trockenen Ammoniak. Zu der entstehenden Lösung gibt man dann so lange kleine Stücke Natrium hinzu, bis eine Blaufärbung erhalten bleibt. Die Blaufärbung wird dann durch Zugabe von wenig L-His x HCl x H_2O wieder entfernt. Danach tropft man unter kräftigem Rühren 16 ml Benzylchlorid hinzu, rührt anschließend noch 45 min. weiter, entfernt das Aceton/CO_2-Bad und dampft den Ammoniak bei R.T. unter Rühren und schwachem Vakuum ab. Der Rückstand wird in 150 ml Eiswasser gelöst und die wässrige Lösung zur Entfernung des überschüssigen Benzylchlorids mit Äther mehrfach extrahiert. Die wässrige Phase wird dann mit 1n H_2SO_4 auf pH 8 - 8,5 gebracht, dabei fällt das N^i-Bzl-L-His als hellbrauner Kristallbrei aus (evtl. erst nach Zugabe von Impfkristallen). Die Umkristallisation erfolgt aus 70%igem Äthanol. (Vorheriges Behandeln mit Aktivkohle hat einen großen Reinigungseffekt.)

Ausbeute: 19,2 g = 60 % d. Th. $C_{13}H_{15}N_3O_2$ MG: 245,3

$N_{ber.}$ = 17,0 % $N_{gef.}$ = 16,8 % $Fp_{Lit.}$ = 248 - 249 °C

$Fp_{gef.}$ = 245 - 247 °C

21. N^α-t-BOC-N^i-Bzl-L-Histidin [9]

49 g (200 mMol) N^i-Bzl-L-His werden in einem Gemisch von 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert, dann werden 42 ml TÄA und 55 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und 48 h bei R.T. gerührt. Man saugt vom nicht umgesetzten N^i-Bzl-L-His ab und engt das Filtrat i. V. ein. Der Rückstand wird mehrfach mit Äthanol/Wasser behandelt, in Pyridin gelöst und mit Aktivkohle ausgeschüttelt. Dann wird 3 mal aus Pyridin/Essigester umkristallisiert. (Das Produkt kann auch in Wasser gelöst werden und mit Eisessig auf pH 5 gebracht werden, wobei dann das Produkt ausfällt. Umfällen aus NaOH (pH 8,3) und Essigsäure (pH 5,0) ist ebenfalls möglich.)

Ausbeute: 33,3 g = 50 % d. Th. $C_{18}H_{23}N_3O_4$ MG: 345,3

$N_{ber.}$ = 12,17 % $N_{gef.}$ = 12,3 % $Fp_{Lit.}$ = 181 - 183 °C

$Fp_{gef.}$ = 180 - 181 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = + 0,5 (c = 1 Eisessig) Lit.

$[\alpha]_{578}^{22}$ = + 0,6 (c = 1 Eisessig) gef.

22. N^{α}-t-BOC-L-Histidin

62 g (400 mMol) L-Histidin (freie Base) werden in 300 ml Wasser und 300 ml Dioxan suspendiert, mit 157 ml (1120 mMol) TÄA und 228 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan versetzt und 78 h bei R.T. gerührt. Danach wird i. V. bei 30 °C eingeengt und 3 mal mit Äthanol/Wasser = 1 : 1 behandelt. Dann wurde in 96%igem Äthanol aufgenommen und nochmals abrotiert. Der Rückstand wird in Pyridin aufgenommen, mit Aktivkohle behandelt und i. V. auf 200 ml eingeengt. Diese Lösung wird unter starkem Rühren in 4 l Essigester eingegossen und das ausfallende Produkt schnell abgesaugt und sofort über $P_2O_5/CaCl_2$ i. V. getrocknet. (Es muß alles sehr schnell gehen, da das anfallende Produkt sehr hygroskopisch ist.) Das getrocknete Produkt wird in Pyridin aufgenommen und die Lösung von ungelöstem L-His abfiltriert. Einengen der Lösung und Zugabe von 96%igem Äthanol ergab das nicht hygroskopische, kristalline N^{α}-t-BOC-L-Histidin.

Ausbeute: 71,5 g = 70 % d. Th. $C_{11}H_{17}N_3O_4$ MG: 255,16

$N_{ber.}$ = 16,85 % $N_{gef.}$ = 16,7 % $Fp_{gef.}$ = 192 °C (Zers.)

$[\alpha]_{578}^{24}$ = + 15,2 (c = 1 Wasser) gef.

23. N-t-BOC-L-Leucin x 1/2 H_2O [9]

66 g (500 mMol) L-Leucin werden in einem Gemisch von 200 ml Wasser

und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugefügt und bei pH 9,75 am pH-Stat mit 4n NaOH titriert (Reaktionsdauer ca. 20 - 30 h).
Das Reaktionsgemisch wird bei 30 °C i. V. bis zur beginnenden Kristallisation des Na-Salzes eingedampft, in Wasser aufgenommen und 3 mal mit 150 ml Äther extrahiert. Die wässrige Phase tropft man unter kräftigem Rühren in eine gut gekühlte Vorlage von einer ausreichenden Menge kalt gesättigter Citronensäure. Nach beendeter Zugabe sollte der pH-Wert bei 2 - 3 liegen. (Sollte der pH höher liegen, so löst man das ausgefallene Produkt mit NaOH nochmals auf und wiederholt die Fällung.)
Das kristallin anfallende N-t-BOC-L-Leu wird abgesaugt, gut gewaschen, noch feucht in THF gelöst, mit Aktivkohle behandelt, filtriert und bis zur beginnenden Kristallisation mit Petroläther versetzt. Beim Abkühlen kristallisiert N-t-BOC-L-Leucin x 1/2 H_2O in weißen Blättchen aus.

Ausbeute: 101 g = 84 % d. Th. $C_{11}H_{21}NO_4 \times 1/2\ H_2O$ MG: 240,3

$N_{ber.}$ = 5,84 % $N_{gef.}$ = 5,83 % $Fp_{Lit.}$ = 78 - 81 °C

$Fp_{gef.}$ = 81 - 82 °C

$[\alpha]_D^{18-25}$ = - 24,0 (c = 1 Eisessig) Lit.

$[\alpha]_D^{25}$ = - 24,4 (c = 1 Eisessig) gef.

24. N-t-BOC-L-Leucin-ONP

24,1 g (100 mMol) N-t-BOC-L-Leu x 1/2 H_2O und 16,7 g p-Nitrophenol werden in 150 ml Essigester gelöst, auf 0 °C abgekühlt und 30,9 g DCCI in wenig Essigester gelöst langsam zugegeben. Anschließend rührt man noch 2 h bei 0 °C und 2 h bei R.T. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, gut mit Essigester gewaschen und das Filtrat mit den Waschflüssigkeiten vereinigt und i. V. bei 30 °C eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Äthanol gelöst und mit viel Petroläther bis zur Trübung versetzt und über Nacht bei - 20 °C zur Kristallisation belassen.

Ausbeute: 21,0 g = 60 % d. Th. $C_{17}H_{24}N_2O_6$ MG: 352,4

$N_{ber.}$ = 7,9 % $N_{gef.}$ = 7,8 % $Fp_{gef.}$ = 91 °C

25. N^{ε}-Z-L-Lysin [23]

25 g (135 mMol) L-Lysin-mono-hydrochlorid werden in 200 ml Wasser gelöst, 25 g basisches Kupfercarbonat zugesetzt und 2 h am Rückfluß gekocht. Die tiefblaue Lösung wird noch heiß vom ungelösten Kupfercarbonat ($2CuCO_3$, $Cu(OH)_2$) abgenutscht und mit etwas heißem Wasser nachgewaschen. Die Kupferlysinat-Lösung wird auf 0 °C abgekühlt, mit 410 g $NaHCO_3$ versetzt und kräftig gerührt. Dann werden innerhalb von 1/2 h 162 g Cbo-Cl unter weiterem Kühlen und Rühren zugetropft. Danach wird noch 1 h bei R.T. weitergerührt und der ausgefallene Kupferkomplex abfiltriert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser und Aceton wird das Produkt i. V. getrocknet. Das trockene Produkt wird in 300 ml Wasser suspendiert, zum Sieden erhitzt, 1 h H_2S eingeleitet, mit 8 ml 5n HCl angesäuert und so der Kupferkomplex zerstört. Danach wurde die Lösung mit Aktivkohle versetzt und heiß abfiltriert. Der Rückstand wird mit 150 ml Wasser ausgekocht und die vereinigten Filtrate mit 4n NaOH auf pH 7,0 gebracht. Beim Erkalten fällt das N^{ε}-Z-Lys aus, das aus 50%-igem Äthanol umkristallisiert wird.

Ausbeute: 30,2 g = 80 % d. Th. $C_{14}H_{20}N_2O_4$ MG: 280,3

$N_{ber.}$ = 10 % $N_{gef.}$ = 10 % $Fp_{Lit.}$ = 250 °

$Fp_{gef.}$ = 248 - 249 °C

$[\alpha]_D^{25}$ = + 14,0 (c = 1,6 2n HCl) Lit.

$[\alpha]_D^{25}$ = + 14,5 (c = 1,6 2n HCl) gef.

26. N^{α}-t-BOC-N^{ε}-Z-L-Lysin [9]

25,5 g (100 mMol) N^{ε}-Z-L-Lys werden in einem Gemisch von 60 ml Was-

ser und 60 ml Dioxan suspendiert, 30 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugefügt und bei pH 10,2 am pH-Stat mit 4n NaOH titriert. Das Reaktionsgemisch wird bei 30 °C i. V. bis zur beginnenden Kristallisation des Na-Salzes eingedampft, in H_2O aufgenommen und 3 mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert und mit Essigester 5 mal extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden mit kalt gesättigter NaCl-Lösung säurefrei gewaschen und mit wasserfreiem $MgSO_4$/Aktivkohle getrocknet. Nach dem Abfiltrieren wird i. V. bei 35 °C die Lösung eingedampft. Das zurückbleibende Öl wurde in wenig Essigester gelöst mit 18 g (110 mMol) Dicyclohexylamin bei 0 °C versetzt, bis zur Trübung mit Petroläther zugegeben und erst bei R.T. und danach bei + 4 °C kristallisiert.

Ausbeute: 48 g = 85 % d. Th. $(C_{12}H_{24}N)^+(C_{19}H_{27}N_2O_6)^-$

$N_{ber.}$ = 7,48 % $N_{gef.}$ = 7,5 % MG: 561,43

$Fp_{Lit.}$ = 110 - 111 °C

$Fp_{gef.}$ = 111,5 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 4,3 (c = 1 Eisessig) Lit.

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 4,8 (c = 1 Eisessig) gef.

48 g des oben erhaltenen N^{ε}-Z-N^{α}-t-BOC-L-Lys-DCHA-Salzes werden in 250 ml Essigester suspendiert. Dann werden 100 ml kalt gesättigte Citronensäurelösung zugegeben und so lange geschüttelt, bis zwei klare Phasen entstanden sind. Die wässrige Phase wird dann abgetrennt und noch 4 mal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen werden mit verdünnter Citronensäurelösung 1 mal und mit konz. NaCl-Lösung 8 - 10 mal gewaschen. Die Essigesterphase wird danach über wasserfreiem $MgSO_4$/Aktivkohle getrocknet und i. V. eingedampft. Aus diesem farblosen, öligen Produkt wurde mit Methylenchlorid eine 1m Lösung hergestellt, die als solche bei der Synthese eingesetzt wurde.

Ausbeute: ca. 90 %

27. N-t-BOC-Phenylalanin [9)]

82,6 g (500 mMol) L-Phenylalanin werden in einem Gemisch von 200 ml Wasser und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und am Autotitrator mit 4n NaOH bei pH 10,1 titriert (Reaktionsdauer ca. 15 h). Das Reaktionsgemisch wird i. V. bei 30 °C auf etwa 100 ml eingeengt, das ausfallende Na-Salz des N-t-BOC-L-Phe durch Zugabe von Wasser wieder gelöst und 3 mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird durch Zugabe von fester Citronensäure unter kräftigem Rühren auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen und das sich ölig abscheidende N-t-BOC-L-Phe mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden über wasserfreiem $MgSO_4$/Aktivkohle getrocknet, filtriert und der Essigester i. V. abgezogen. Der Rückstand wird in Äther gelöst und nochmals i. V. eingedampft. Das zurückbleibende Produkt wird in wenig Äther gelöst und durch Zugabe von Petroläther zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 119 g = 90 % $C_{14}H_{19}NO_4$ MG: 265,3

$N_{ber.}$ = 5,29 % $N_{gef.}$ = 5,3 % $Fp_{Lit.}$ = 84 - 86 °C

$Fp_{gef.}$ = 86 - 87 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 4,0 (c = 1 Eisessig) Lit.

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 4,1 (c = 1 Eisessig) gef.

28. N-t-BOC-L-Phenylalanin-ONP

26,5 g (100 mMol) N-t-BOC-L-Phenylalanin und 16,7 g p-Nitrophenol werden in 150 ml Essigester gelöst, auf 0 °C abgekühlt und 20,6 g DCCI in wenig Essigester zugegeben. Man rührt 2 h bei 0 °C und 2 h bei R.T., saugt den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und wäscht gut mit Essigester nach. Die Waschflüssigkeiten und das Filtrat werden vereinigt und i. V. bei 30 °C eingedampft. Der Rückstand wird aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 34,8 g = 90 % d. Th. $C_{20}H_{22}N_2O_6$ MG: 386,4

$N_{ber.}$ = 7,25 % $N_{gef.}$ = 7,3 % $Fp_{gef.}$ = 127 - 128 °C

$[\alpha]_D^{18-25}$ = 12,0 (c = 1 Methanol) gef.

29. N-t-BOC-O-Bzl-L-Serin [9]

18,3 g (100 mMol) O-Bzl-L-Ser werden in 60 ml Wasser und 60 ml Dioxan suspendiert, 30 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und am pH-Stat bei pH 9,5 mit 4n NaOH titriert. Das Reaktionsgemisch wird i. V. bei 30 °C bis zur beginnenden Kristallisation des Na-Salzes eingeengt. Das Na-Salz wird mit Wasser wieder in Lösung gebracht und 3 mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird durch Zugabe von fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert und das abgeschiedene Öl mit Essigester mehrmals extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden mit kalt gesättigter NaCl-Lösung säurefrei gewaschen und über wasserfreiem $MgSO_4$/Aktivkohle getrocknet. Nach dem Filtrieren wird der Essigester i. V. abgezogen und der Rückstand aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 16 g = 61 % d. Th. $C_{14}H_{21}NO_5$ MG: 263,2

$N_{ber.}$ = 5,33 % $N_{gef.}$ = 5,3 % $Fp_{gef.}$ = 57 - 59 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = + 34,8 (c = 1 THF) gef.

30. O-Bzl-L-Tyrosin [24]

144,8 g (800 mMol) L-Tyrosin werden mit 400 ml 2n NaOH 15 min. gerührt. Zu der auf 40 °C erwärmten, gelblichen Lösung werden 100 g $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ in 250 ml Wasser gelöst hinzugegeben und 3 h bei 40 °C kräftig gerührt. Der ausgefallene, blaue Kupferkomplex wird mit 3 l Methanol und 400 ml 2n NaOH in Lösung gebracht, die blaugrüne Lö-

sung noch 10 min. gerührt und dann vom Ungelösten abzentrifugiert. Zu der klaren Lösung werden 100 ml Benzylbromid auf einmal hinzugegeben und im geschlossenen Gefäß 100 min. bei R.T. gerührt. Das ausgefallene, blaue O-Bzl-Kupfertyrosinat wird abgesaugt und mit Wasser/Methanol = 3,5 : 1 gewaschen, bis das Filtrat farblos ist. Das Produkt wird bei 50 °C 2 Tage getrocknet.
Zur Zerstörung des Kupferkomplexes wird mehrmals mit 1n HCl verrieben, abgesaugt, mit Wasser, verd. Ammoniak und Aceton sorgfältig gewaschen und aus 80%iger Essigsäure umkristallisiert.

Ausbeute: 158,5 g = 50 % d. Th. $C_{16}H_{17}NO_3$ MG: 271,23

$N_{ber.}$ = 6,99 % $N_{gef.}$ = 7,0 % $Fp_{Lit.}$ = 223 °C

$Fp_{gef.}$ = 222 - 224 °C

$[\alpha]_D^{18-25}$ = - 9,9 (c = 1 80 % Essigsäure) Lit.

$[\alpha]_D^{18-25}$ = - 10,0 (c = 1 80 % Essigsäure) gef.

31. N-t-BOC-O-Bzl-L-Tyrosin [9]

68 g (250 mMol) O-Bzl-L-Tyr werden in 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert, 75 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und am Autotitrator unter starkem Rühren bei pH 10,4 mit 4n NaOH titriert (Reaktionsdauer ca. 24 h).
Das Reaktionsgemisch wird bei 30 °C i. V. weitgehend eingedampft, mit Wasser aufgenommen und 3 mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, dabei wird kräftig gerührt. Das N-t-BOC-O-Bzl-L-Tyr wird mit Essigester extrahiert, dabei geht ein Teil der beim Ansäuern ausgefallenen Substanz (wahrscheinlich unumgesetztes O-Bzl-L-Tyr) nicht in Lösung. Nachdem vom Unlöslichen abfiltriert worden ist, trennen sich zwei klare Phasen. Die abgetrennte, unlösliche Substanz und die wässrige Phase werden gut mit Essigester gewaschen. Die vereinigten Essigesterextrakte werden einmal mit verd. Citronensäurelösung und 10 mal mit kalt gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über wasserfreiem $MgSO_4$/Aktiv-

kohle getrocknet, abfiltriert und i. V. eingedampft. Die Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petroläther unter starkem Rühren.

Ausbeute: 74,1 g = 80 % d. Th. $C_{21}H_{25}NO_5$ MG: 371,4

$N_{ber.}$ = 3,76 % $N_{gef.}$ = 3,73 % $Fp_{Lit.}$ = 109 - 110 °C

$Fp_{gef.}$ = 108 - 109 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = + 12,1 (c = 1 Aceton) Lit.

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = + 12,0 (c = 1 Aceton) gef.

32. N-t-BOC-O-Bzl-L-Tyrosin-ONP [25]

Zu einer Lösung von 37,2 g (100 mMol) N-t-BOC-O-Bzl-L-Tyr und 16,7 g (120 mMol) p-Nitrophenol in 100 ml absolutem THF werden bei 0 °C 20,6 g DCCI in wenig THF gegeben. Man rührt 12 h bei 0 °C und 6 h bei R.T. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, gut mit absolutem THF gewaschen und die Waschflüssigkeiten mit dem Filtrat vereinigt. Die vereinigten THF-Extrakte werden i. V. bei 30 °C eingedampft. Der Rückstand wird mehrmals aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 44,5 g = 90 % d. Th. $C_{27}H_{28}N_2O_7$ MG: 492,5

$N_{ber.}$ = 5,69 % $N_{gef.}$ = 5,7 % $Fp_{Lit.}$ = 145 - 146 °C

$Fp_{gef.}$ = 144 - 145 °C

$[\alpha]_D^{24}$ = - 30,2 (c = 1 DMF) Lit.

$[\alpha]_D$ = - 30,0 (c = 1 DMF) gef.

33. N-t-BOC-L-Valin [9]

59 g (500 mMol) L-Valin werden in 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert, 150 ml 4m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und

am pH-Stat mit 4n NaOH bei pH 9,5 titriert (Reaktionsdauer ca. 24 h). Das Reaktionsgemisch wird i. V. bei 30 °C weitgehend eingedampft, wieder mit Wasser aufgenommen und 3 mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend bei 0 °C mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 gebracht und das ölige Produkt mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen werden 10 mal mit kalt gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über wasserfreiem $MgSO_4$/Aktivkohle getrocknet. Nach dem Abfiltrieren wird i. V. bei 30 °C der Essigester abgezogen, in Äther wieder gelöst und nochmals i. V. abgezogen. Der Rückstand wird aus Äther/Petroläther (evtl. unter Zusatz von Impfkristallen) umkristallisiert.

Ausbeute: 92 g = 84 % d. Th. $C_{10}H_{19}NO_4$ MG: 271,3

$N_{ber.}$ = 6,45 % $N_{gef.}$ = 6,5 % $Fp_{Lit.}$ = 72 - 73 °C

$Fp_{gef.}$ = 76 - 78 °C

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 6,0 (c = 1 Eisessig) Lit.

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 6,2 (c = 1 Eisessig) gef.

e) Allgemeine Methoden

1. Chlormethylierung des Merrifield-Harzes [26]

50 g Merrifield-Harz (Copolymer aus 98 % Styrol und 2 % Divinylbenzol, 200 - 400 mesh (Fluka) werden nacheinander mit je 1000 ml 1n NaOH, 1000 ml 1n HCl, 1500 ml Wasser, 800 ml DMF und 1300 ml Methanol gut gewaschen. Nach dem Trocknen wird das Harz in einem 1 l-Dreihalskolben mit 200 ml Chlormethyl-methyläther und ca. 150 ml Chloroform versetzt und die Suspension bei R.T. 1 h gerührt. Dann wird auf 0 °C abgekühlt, mit 5 ml $SnCl_4$ in 50 ml Chlormethylmethyläther zugegeben und eine weitere Stunde gerührt. Danach wird abfiltriert, mit je 500 ml Dioxan/Wasser = 3 : 1, 500 ml Dioxan/3n HCl =

3 : 1, 500 ml Dioxan/Methanol = 1 : 1, 500 ml Dioxan/Methanol = 0,5 : 1, 500 ml Dioxan/Methanol = 0,25 : 1, 500 ml Dioxan/Methanol = 0,125 : 1, 500 ml Dioxan/Methanol = 0,0625 : 1 und schließlich mit 1000 ml Methanol gewaschen. Nach dem Trocknen ergibt sich ein Harz vom Chlormethylierungsgrad 4,61 - 5,00 %.

2. Anesterung von N-t-BOC-L-Alanin an das Trägerharz [27]

50 g des oben erhaltenen, chlormethylierten Harzes werden in 200 ml Essigester/Äthanol = 1 : 1 suspendiert, mit 16,25 g (70 mMol) N-t-BOC-L-Ala und 9,85 ml TÄA versetzt und unter Rühren 48 h bei 80 °C am Rückfluß gekocht. Nach beendeter Reaktion wird abfiltriert, 4 mal mit je 300 ml Äthanol/Essigester = 1 : 1, 4 mal mit je 300 ml Äthanol/Essigester = 3 : 1 und schließlich mit je 300 ml Methanol 4 mal gewaschen. Das getrocknete Harz zeigte eine Beladung von 0,358 - 0,449 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz.

3. Anesterung von N^{ε}-Z-N^{α}-t-BOC-L-Lysin an das Trägerharz

10 g chlormethyliertes Harz werden in 50 ml Essigester/Äthanol = 1 : 1 suspendiert, mit 15 ml einer 1m Lösung von N^{ε}-Z-N^{α}-t-BOC-L-Lys in Essigester (15 mMol) und 1,97 ml TÄA versetzt und unter Rühren 48 h bei 80 °C am Rückfluß gekocht. Nach beendeter Reaktion wird abfiltriert, 4 mal mit je 100 ml Äthanol/Essigester = 1 : 1, 4 mal mit je 100 ml Äthanol/Essigester = 3 : 1 und schließlich 4 mal mit je 100 ml Methanol gewaschen. Das getrocknete Harz zeigte eine Beladung von 0,28 - 0,30 mMol N^{ε}-Z-N^{α}-t-BOC-L-Lys/g Harz.

4. Allgemeiner Verlauf der Merrifield-Synthese unter Verwendung von p-Nitrophenylestern [28]

In ein zylindrisches Gefäß mit schräg aufgesetztem Schliffeinfüllstutzen und in Achsenrichtung angebrachtem Auslaßhahn mit vorgeschalteter Fritte wird eine berechnete Menge Trägerharz, das mit der geschütz-

ten, ersten, carboxylendständigen Aminosäure (wie vor beschrieben) verestert ist, eingewogen. Dieses Harz wird 3 mal 3 min. mit DMF, 3 mal 3 min. mit Äthanol und 3 mal 3 min. mit Eisessig gewaschen. Zur Abspaltung des t-BOC-Restes läßt man 30 min. 1n HCl in Eisessig einwirken. Danach wird 3 mal 3 min. mit Eisessig, 3 mal 3 min. mit Äthanol und 3 mal 3 min. mit DMF gewaschen. Mit zwanzigfachem Überschuß der berechneten Menge an TÄA in DMF wird das Hydrochlorid während 15 min. abgespalten. Die so erhaltene, freie Aminkomponente wird noch 3 mal 3 min. mit DMF ausgewaschen. Dann wird eine ca. 1m Lösung (in vierfachem Überschuß von der berechneten Menge) der in der Sequenz vom C-Terminus her folgenden, geschützten und ONP-aktivierten Aminosäure in DMF zugegeben und unter Schütteln 48 h reagieren gelassen. Alle Wasch- und Abspaltungsprozesse werden unter Schütteln des Reaktionsgefässes durchgeführt. Die Kupplungsreaktion ist wegen der Lichtempfindlichkeit der p-Nitrophenylester unter Lichtausschluß durchzuführen. Nach beendeter Reaktion wird der beschriebene Wasch- und Abspaltcyclus wiederholt. Da die p-Nitrophenylester von Arg, Val und His schlecht darstellbar sind, muß bei der Synthese der verkürzten B-Ketten Arg(22), Val(18, 12 und 2) sowie His(10 und 5) mit DCCI angekuppelt werden.

5. Allgemeiner Verlauf der Merrifield-Synthese unter Verwendung von DCCI als Kupplungsreagenz [29)]

In das oben beschriebene Gefäß wird wieder die berechnete Menge verestertes Trägerharz eingewogen. Dieses Harz wird 4 mal 2 min. mit Methylenchlorid/Eisessig = 1 : 1 gewaschen. Dann wird zur Abspaltung des t-BOC-Restes 30 min. mit 1n HCl in Eisessig behandelt. Nach beendeter Abspaltung wird das Harz 3 mal 2 min. mit Methylenchlorid/Eisessig = 1 : 1 und 3 mal 2 min. mit Methylenchlorid gewaschen. Danach wird zur Abspaltung des Hydrochlorids 15 min. mit dem zwanzigfachen Überschuß der berechneten Menge an TÄA in Methylenchlorid behandelt. Dann wird 3 mal 3 min. mit Methylenchlorid ausgewaschen. Zu der so erhaltenen freien Aminkomponente wird eine ca. 1m Lösung in 4fachem Überschuß von der berechneten Menge der in der Sequenz vom

C-Terminus her folgenden, geschützten Aminosäure in Methylenchlorid zugegeben und 5 min. unter Schütteln einziehen gelassen. Danach wird eine der eingesetzten Menge an geschützter Aminosäure äquivalente Menge 2m DCCI-Lösung in Methylenchlorid zugegeben und eineinhalb Stunden reagieren gelassen. Nach beendeter Reaktion wird der beschriebene Wasch- und Abspaltungscyclus wiederholt. Da während der Kupplung von N-t-BOC-L-Asn und N-t-BOC-L-Gln mit DCCI an der Carbamidgruppe Nitrilbildung festgestellt worden ist [42-43], werden diese Aminosäuren bei der Synthese der verkürzten B-Ketten als p-Nitrophenylester eingesetzt.

6. Allgemeine Methode zur Ablösung des fertigen, geschützten Peptids vom Trägerharz

Das noch am Trägerharz befindliche Peptid, das entweder mit p-Nitrophenylestern oder mit DCCI synthetisiert worden ist, wird nach der Ankupplung der letzten Aminosäure wieder dem jeweiligen Waschprozeß unterworfen, jedoch wird anstatt der Behandlung mit 1n HCl in Eisessig ein abschließendes Waschen von 6 mal 2 min. mit Methylenchlorid durchgeführt. Das noch feuchte Peptidharz wird im Reaktionsgefäß belassen und mit wasserfreier Trifluoressigsäure (Gefäß 3/4 voll) versetzt. Dem Schliffeinfüllstutzen wird ein gebogenes $CaCl_2$-Rohr aufgesetzt und durch den Auslaßhahn wird 1 h lang trockener HBr eingeleitet. Nach 1 h wird die TFA in einen Rundkolben filtriert und das Trägerharz mehrmals mit TFA gut ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden i. V. bei R.T. eingedampft, mehrmals in TFA aufgenommen und wieder i. V. bei R.T. eingedampft. Danach wird das ölige, braunstichige Produkt in wenig TFA aufgenommen und mit viel absolutem Äther versetzt. Das ausgefallene, weiße Peptid wird abzentrifugiert und mehrmals mit absolutem Äther gewaschen. Das so erhaltene, teilgeschützte Peptid wird i. V. über P_2O_5/KOH getrocknet. (Sollte beim Versetzen mit Äther eine nicht zentrifugierbare milchige Lösung entstehen, so muß der Äther i. V. abgedampft und das Produkt noch mehrmals mit TFA abrotiert werden.)

7. Abspaltung des N^G-Tos-, N^i-Bzl- und des S-Bzl-Restes mit Natrium in flüssigem Ammoniak

Um bei der Abspaltung völlig feuchtigkeits- und luftfrei zu arbeiten, wird mit einer von S. HÖRNLE (unveröffentlicht) konstruierten Schliffapparatur gearbeitet.

Zu Beginn werden 200 mg teilgeschütztes Peptid zusammen mit einem glasüberzogenen Magnetrührer in den Reaktionskolben gefüllt. Das metallische Na wird in den Bauch eines seitlichen Ansatzstutzens gelegt und alle Schliffe mit Schliffedern abgesichert. Der Absaugstutzen wird mit einem Trockenrohr (NaOH-Plätzchen) versehen. In die mit dem Vorratsgefäß durch einen PVC-Schlauch verbundene, mit Na-Stückchen versehene und mit Aceton/Trockeneis gekühlte Kühlfalle leitet man das zu kondensierende NH_3-Gas ein. Nachdem die Kühlfalle 3/4 mit flüssigem Ammoniak gefüllt ist, klemmt man die Gaszufuhr ab und stellt die Kühlung ein. Dann bringt man das Vorratsgefäß in das Aceton-/Trockeneis-Bad ein und destilliert den Ammoniak bei R.T. von der Kühlfalle in das Vorratsgefäß. Nachdem das Vorratsgefäß mit flüssigem Ammoniak gefüllt ist, wird es von der Kühlfalle abgeklemmt. Durch langsames, vorsichtiges Drehen der Apparatur werden ca. 120 ml flüssiger NH_3 vom Vorratsgefäß in den vorgekühlten Reaktionskolben eingegossen und in ihm das teilgeschützte Peptid vollständig gelöst.

Durch vorsichtiges Kippen der Apparatur läßt man die im Seitenstutzen gelagerten Na-Stückchen in den im Vorratsgefäß verbliebenen flüssigen Ammoniak gleiten. Durch gelindes Schütteln wird das Na in Lösung gebracht. Die dunkelblaue Lösung läßt man dann in den Reaktionskolben fließen und zwar soviel, daß dort eine 1minütige Blaufärbung bestehen bleibt. Nach dieser Zeit wird soviel festes NH_4Cl zu der Reaktionslösung zugegeben, bis die blaue Farbe verschwindet. (Die ganze Reaktion wird unter Rühren durchgeführt.) Nach beendeter Reaktion wird das Trockenrohr entfernt und der Absaugstutzen mit der Wasserstrahlpumpe verbunden. Im Wasserstrahlvakuum wird die Reaktionslösung eingefroren und so über Nacht lyophilisiert.

8. Sulfitolyse der reduzierten Ketten [30, 31]

Der Rückstand, der nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wird (reduzierte Kette), wird in 8 ml eiskaltem Wasser aufgenommen und mit NaOH auf pH 9,2 eingestellt. Danach werden 20 ml 0,2m Trispuffer pH 9,2, 1 g wasserfreies Na_2SO_3 und 0,8 g $Na_2S_4O_6$ zugegeben und 3 h bei 37 °C inkubiert. Das Inkubationsprodukt wird dialysiert und anschließend lyophilisiert.
Die Ketten mit SÄM-Schutz werden ohne Behandlung mit $Na/NH_{3fl.}$ sofort auf diese Weise sulfitolysiert.
Alle so erhaltenen $B(SSO_3^-)_2$-Ketten werden ohne weitere Reinigung für die Austestung der Primäraktivität mit nativer Rinderinsulin-A-Kette rekombiniert.

9. Darstellung der nativen Rinderinsulin-$A(SSO_3^-)_4$-Kette aus Rinderinsulin [32 - 34]

1 g Rinderinsulin wird in 40 ml 0,2m Phosphatpuffer (KH_2PO_4/Na_2HPO_4) pH 7,4 in 4m Harnstoff gelöst, anschließend mit 1,4 g wasserfreiem Na_2SO_3 und 0,7 g $Na_2S_4O_6$ versetzt und 20 h bei R.T. belassen. Danach wird 6 h bei + 3 °C dialysiert (mehrmals Wasser wechseln). Nach beendeter Dialyse wird der Schlauchinhalt unter Rühren mit Essigsäure auf pH 6,4 gebracht. Der Niederschlag, der sich während 15 min. bei 0 °C im Eisbad bildet ($B(SSO_3^-)_2$-Kette), wird abzentrifugiert. Der Überstand enthält die noch mit $B(SSO_3^-)_2$-Kette verunreinigte $A(SSO_3^-)_4$-Kette.
Der Niederschlag wird in 75 ml Wasser aufgewirbelt, durch tropfenweise Zugabe von 1n NH_4OH gelöst (dabei nicht über pH 9,0 gehen) und durch Einstellen des pH auf 6,4 mit 1n Essigsäure wieder gefällt. Der sich beim Stehen im Eisbad bildende Niederschlag wird wieder abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden unter Zusatz von ca. 4 Tropfen 1-Octanol i. V. bis auf 20 - 30 ml bei 25 °C eingedampft, im Zentrifugenglas mit 1n Essigsäure auf pH 5,0 gebracht und 1 h im Eisbad stehen gelassen. Danach wird abzentrifugiert, bei + 3 °C dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Das Lyophilisat wird in ca. 10 ml 2,6m Ameisensäure / 8m Harnstoff gelöst und auf eine Dowex 50 W x 2-Säule (mit 2,6m Ameisensäure / 8m Harnstoff äquilibriert) aufgetragen (Säule: l = 25 cm ∅ 1,2 cm). Die Elution der $A(SSO_3^-)_4$-Kette erfolgte mit 2,6m Ameisensäure / 8m Harnstoff und einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 35 ml/h (UV 280 nm). Die eluierte $A(SSO_3^-)_4$-Kette wird bei + 3 °C dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Die so erhaltene $A(SSO_3^-)_4$-Kette zeigte nach Rekombination mit sich selbst im Mäusekrampftest bei einer Dosierung von 400 γ/Maus keinerlei Aktivität. Auch die Elektrophorese zeigte nur eine Bande und bestätigte somit die Reinheit der gewonnenen Kette, die deshalb zur Rekombination mit den verkürzten, synthetischen B-Ketten verwendet wurde.

10. Kombination synthetischer B-Ketten mit nativer A-Kette [35]

Alle Lösungen, die bei der Rekombination verwendet werden, sind mit bidest. Wasser, das vorher intensiv unter Stickstoffatmosphäre gekocht wird, anzusetzen. Die Reduktion der $A(SSO_3^-)_4$-Kette und die nachfolgende Extraktion des Mercaptoäthanols werden in einer kleinen Kutscher-Steudel-Apparatur vorgenommen, die mit einem Gaseinleitungsrohr versehen ist.

20 mg $A(SSO_3^-)_4$-Kette werden in die beschriebene Kutscher-Steudel-Apparatur eingewogen, in 5 ml H_2O bidest. gelöst, auf pH 5,0 eingestellt, unter N_2-Durchfluß mit 1 ml 1m Mercaptoäthanollösung versetzt (46facher Überschuß) und 6 min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Danach wird die trübe Lösung im Eisbad unter kontinuierlichem N_2-Strom gekühlt (ca. 8 min.) und mit dest. Essigester überschichtet. Nach genügender Kühlung wird die Apparatur mit der Destillationsblase, die ca. 300 ml Essigester und 11 g fein zerriebenes Bleiacetat enthält, gekuppelt und das Mercaptoäthanol unter N_2-Durchfluß und ständiger Eiskühlung während 3 h extrahiert. Nach erfolgter Extraktion wird der überstehende Essigester abgesaugt und die infolge der ausgefallenen, reduzierten A-Kette gallertige Lösung durch Überspülen mit N_2 essigesterfrei gemacht. Das Reduktionsgemisch wird in ein kleines Gefäß auf 5 mg $B(SSO_3^-)_2$-Kette gegossen, das Reduktionsgefäß mit 1 ml

H_2O bidest. und 1 ml 0,1n NaOH gründlich gespült und dann der pH mit 0,1n NaOH unter Eiskühlung und N_2-Strom auf 10,6 eingestellt. Die so erhaltene, klare Lösung wird mit 1,5 ml 0,1m Glycinpuffer versetzt und über Nacht im Kühlschrank bei + 3 °C zur Oxydation belassen. Nach ca. 20 - 22 h wird die Kombinationslösung mit 1n HCl auf pH 7,5 eingestellt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bis zur Testung in Eis gekühlt und noch am gleichen Tag verbraucht.

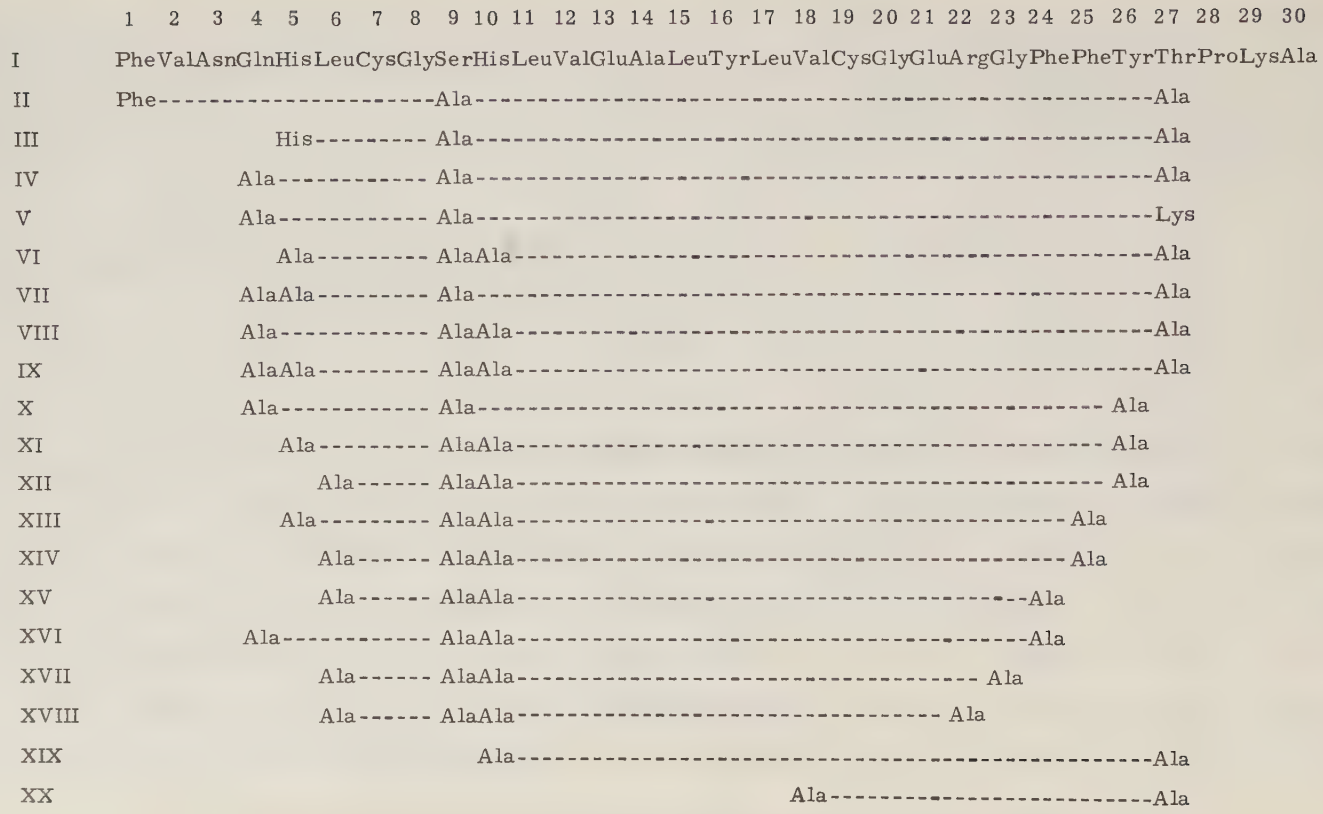
Berechnet auf die im Unterschuß zugegebene B-Kette können in den 10 ml Lösung bei Annahme 100%iger Kombination 8 mg Hybridinsulin enthalten sein. Auf diesen Wert werden die prozentualen Aktivitäten des biologischen Tests bezogen.

11. Biologischer Test

Zur Aktivitätsbestimmung der Hybridinsuline wird der Mäusefalltest benutzt. Dieser Test beruht auf der Tatsache, daß Mäuse, denen 30 h das Futter entzogen wurde, sehr schnell auf intraperitonial injiziertes Insulin ansprechen.
Infolge der starken Blutzuckersenkung, die das Insulin bewirkt, erlahmt die Beinmuskulatur der Mäuse, sie können sich nicht mehr am Maschengitter einer langsam rotierenden, schräggestellten Trommel festhalten und fallen unter Krämpfen in einen bereitgestellten Behälter. Die Zahl der in einer bestimmten Zeit heruntergefallenen Mäuse ist ein Maß für die Aktivität des getesteten Hybridinsulins.
An einer Eichkurve, die mit kristallinem Rinderinsulin an ca. 2000 Mäusen ermittelt wurde, kann die Aktivität in % abgelesen werden. Die Aktivität im kristallinen Rinderinsulin wird gleich 100 % gesetzt. Die Mäuse, die möglichst ein Gewicht zwischen 18 und 25 g haben sollen, werden 30 h vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt.
Die in Gruppen von je 10 Tieren mit der gleichen Gewichtsverteilung eingeteilten Mäuse werden 5 h vor Versuchsbeginn in den auf 30 °C temperierten Versuchsraum gebracht. Danach wird den Mäusen intraperitonial 0,1 ml/Maus = z. B. 80 γ Insulin der beschriebenen Kombinationslösung injiziert. Nach der Injektion werden die Mäusegruppen

sofort in die Maschendrahtzylinder (s. o.) gesetzt. Fällt eine Maus innerhalb von 8 min. nach der Injektion aus dem Zylinder, so wird sie gekennzeichnet und dann wieder in die Trommel zurückgesetzt.

Nach 45 min. wird erstmals abgelesen und nach 60 min. erfolgt die Endablesung. Je nachdem, wieviele Mäuse gefallen sind und welchen Grad an Krämpfen sie zeigen, wird die Dosis erhöht oder erniedrigt. Dabei soll eine Dosis gefunden werden, die eine Fallrate von 6 - 7 Mäusen bewirkt. Diese Mäusezahl ist deshalb günstig, weil sie in der aufgestellten Eichkurve im linearen Bereich liegt und deshalb sehr genaue Werte liefert.
Wenn man diese optimale Dosis gefunden hat, werden mindestens 100 Mäuse in den Test genommen. Der Durchschnittswert aus diesen 10 Teilwerten erbringt dann die Insulinkonzentration in %, die in der Testlösung enthalten ist.
In der verwendeten Testmaschine können maximal 12 Mäusegruppen = 120 Mäuse gleichzeitig getestet werden.



Schema der synthetisierten, verkürzten und variierten B-Ketten II - XX. (I = Sequenz der nicht synthetisierten, nativen B-Kette)

Tabelle 1: Aminosäureanalysen der verkürzten und variierten B-Ketten

Kette Nr.		II	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
Aminosäure		roh	gereinigt						roh	gereinigt												
Asp	gef.	0,69	0,93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	theor.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	gef.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	theor.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	gef.	2,64	3,00	1,96	1,96	1,94	1,88	1,99	1,97	2,00	1,91	2,07	1,97	2,01	2,01	2,02	2,09	2,05	2,02	2,04	2,00	0,98
	theor.	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
Gly	gef.	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	theor.	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2
Ala	gef.	3,03	2,92	2,92	3,89	2,96	4,95	4,85	4,77	4,95	5,96	3,82	4,70	4,84	5,10	4,84	5,01	4,84	4,95	4,89	2,90	2,00
	theor.	3	3	3	4	3	5	5	5	5	6	4	5	5	5	5	5	5	5	5	3	2
Val	gef.	2,56	2,89	1,88	1,89	1,96	1,91	2,09	1,93	1,98	1,83	1,97	2,06	1,97	2,00	2,05	2,03	1,93	2,02	1,89	1,97	0
	theor.	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
Leu	gef.	3,66	4,00	3,74	3,95	3,92	3,82	4,14	3,84	3,99	3,74	3,87	3,90	3,15	3,91	3,01	3,02	3,92	3,01	3,14	2,96	0
	theor.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	3	4	3	3	3	0
Tyr	gef.	1,55	1,98	1,64	1,75	1,69	1,75	1,73	1,70	1,98	1,73	0,77	0,92	0,78	0,84	0,89	0,87	0,88	0,98	1,01	2,02	0,89
	theor.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Phe	gef.	3,06	2,99	2,29	2,43	1,97	2,19	1,98	2,02	1,99	2,01	2,14	1,75	1,88	1,03	0,91	0	0	0	0	2,01	2,09
	theor.	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2
Lys	gef.	0	0	0	0	0,95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	theor.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	gef.	1,41	1,89	1,38	1,51	1,74	0	0,71	0,72	1,01	0	1,32	0	0	0	0	0	0,78	0	0	0	0
	theor.	2	2	2	2	2	0	1	1	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Arg	gef.	1,11	1,04	1,12	1,20	1,01	1,10	1,08	1,00	1,02	0,98	1,05	0,98	0,94	1,01	0,98	1,00	0,96	1,05	0	1,04	1,02
	theor.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Cys	gef. +)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	theor.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1

+) Cystein wurde nicht bestimmt, da es bei der Hydrolyse weitgehend zerstört wird.

Tabelle 2: Primäraktivitäten der synthetischen, gekürzten und variierten B-Ketten

Nr. im Schema und Text	Synthetische B-Ketten	Aktivität im Mäusefalltest			
		Mittelwert (%)	Standardabweichung S	% v. Mittelwert	Zahl der Mäuse
II	(Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(1-27)-heptacosipeptid	5,5	± 0,95	± 17	150
III	(Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(5-27)-tricosipeptid	0,4	± 0,07	± 18	110
IV	(Ala^{4}, Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid	5,5	± 0,81	± 16	110
V	(Ala^{4}, Ala^{9}, Lys^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid	5,5	± 0,40	± 7	120
VI	(Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(5-27)-tricosipeptid	2,8	± 0,41	± 15	200
VII	(Ala^{4}, Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid	2,6	± 0,39	± 15	130
VIII	(Ala^{4}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid	5,5	± 0,65	± 12	180
IX	(Ala^{4}, Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid	2,7	± 0,45	± 17	150
X	(Ala^{4}, Ala^{9}, Ala^{26})B-Kette-(4-26)-tricosipeptid	2,5	± 0,32	± 13	130
XI	(Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{26})B-Kette-(5-26)-dicosipeptid	2,0	± 0,26	± 13	150
XII	(Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{26})B-Kette-(6-26)-heneicosipeptid	1,5	± 0,29	± 19	120
XIII	(Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{25})B-Kette-(5-25)-heneicosipeptid	1,5	± 0,31	± 21	120
XIV	(Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{25})B-Kette-(6-25)-eicosipeptid	1,2	± 0,14	± 12	120

Nr. im Schema und Text	Synthetische B-Ketten	Aktivität im Mäusefalltest			
		Mittelwert (%)	Standardabweichung S	% v. Mittelwert	Zahl der Mäuse
XV	(Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{24})B-Kette-(6-24)-nonadecapeptid	1,0	± 0,10	± 10	140
XVI	(Ala^{4}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{24})B-Kette-(4-24)-heneicosipeptid	1,3	± 0,14	± 11	160
XVII	(Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{23})B-Kette-(6-23)-octadecapeptid	1,0	± 0,27	± 27	150
XVIII	(Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{22})B-Kette-(6-22)-heptadecapeptid	0	0	0	140
XIX	(Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(10-27)-octadecapeptid	2,0	± 0,22	± 11	170
XX	(Ala^{18}, Ala^{27})B-Kette-(18-27)-decapeptid	1,0	± 0,10	± 10	180
	Aktivitäten der an SE-Sephadex C-25 gereinigten B-Ketten				
II	(Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(1-27)-heptacosipeptid	25,0	± 0,50	± 2	280
VIII	(Ala^{4}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid	25,2	± 0,63	± 4	280
	Aktivitäten der gereinigten Kombinate (Sephadex G-50 superfine, 1n Essigsäure)				
II	(Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(1-27)-heptacosipeptid	75,3	± 12,8	± 17	180
VIII	(Ala^{4}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid	75,0	± 12,7	± 17	180

III. ERGEBNISSE

a) Darstellung der verkürzten und variierten Insulin-B-Ketten mit der Merrifield-Synthesetechnik

(Die Nummern der Ketten stimmen mit den Nummern im Schema (s. o.) überein.)

1. Kette II (Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(1-27)-heptacosipeptid

1 g N-t-BOC-L-Ala-Harz (mittlere Beladung von 0,403 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz) wurde in ein Merrifieldgefäß eingewogen.
Nach der p-Nitrophenylester-Methode wurden nacheinander folgende, oben beschriebene, geschützte Aminosäuren an das am Harz befindliche L-Alanin ankondensiert: Tyr, Phe, Phe und Gly.
Das darauffolgende Arg wurde mit der DCCI-Methode angekuppelt. Danach wurden nacheinander Glu, Gly und Cys mit der p-Nitrophenylester-Methode ankondensiert. Das nachfolgende Val wurde wieder mit DCCI angeknüpft. Leu, Tyr, Leu, Ala und Glu wurden anschließend als p-Nitrophenylester eingesetzt. Das darauffolgende Val wurde mit DCCI ankondensiert. Danach folgten Leu als P-Nitrophenylester und His mit DCCI. Ala, Gly, Cys und Leu wurden wieder als p-Nitrophenylester verwendet, während das nachfolgende His mit DCCI angekuppelt wurde. Gln und Asn wurden als p-Nitrophenylester eingesetzt, während für das folgende Val DCCI als Kupplungsreagenz verwendet wurde. Das aminoendständige Phe wurde schließlich als p-Nitrophenylester aufgebracht.
Nach dem Abspalten vom Trägerharz ergab sich eine Ausbeute an teilgeschütztem Peptid von 83 %, bezogen auf die erste, carboxylendständige Aminosäure.
Zur Kontrolle und zum Vergleich der beiden Methoden wurde diese Kette nochmals mit der DCCI-Methode synthetisiert. Dabei mußten Gln B4 und Asn B3 aus den schon beschriebenen Gründen der Gefahr der Nitrilbildung bei Verwendung von DCCI als Kupplungsreagenz als p-Nitrophenylester eingesetzt werden.

Sämtliche Aminosäurederivate wurden bei allen Kettensynthesen, auch bei der DCCI-Methode, in fünffachem Überschuß eingesetzt.
Die nach der p-Nitrophenylester-Methode synthetisierte Kette zeigte ebenso wie die mit DCCI hergestellte Kette nach der Kombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette im Mäusefalltest eine Primäraktivität von 5,5 %.
Die Aminosäureanalysen (s. Tab. 1, S. 40) waren gleichwertig und auch die Elektropherogramme der beiden Ketten zeigten keine Unterschiede. Da die DCCI-Methode, wie beschrieben, den erheblichen Vorteil einer sehr viel kürzeren Synthesedauer hat, wurden alle nachfolgenden Ketten mit dieser Methode synthetisiert.

2. Kette III (Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(5-27)-tricosipeptid

Diese Kette wurde durchweg mit der DCCI-Methode synthetisiert.
Es wurde ein Ansatz von 2 g Ala-Harz (= mittlere Beladung von 0,807 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz) genommen. Nach beendeter Synthese des Teilstückes Leu(7) bis Ala(27) wurde die Hälfte des Peptidharzes abgelegt. Mit der anderen Hälfte wurde bis His(5) weitersynthetisiert. Danach wurde wieder halbiert und die eine Hälfte zur Abspaltung des Peptids verwendet.
Die Ausbeute an teilgeschützter Kette betrug 86 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Das daraus hergestellte Hybridinsulin zeigte im biologischen Test eine Primäraktivität von 0,4 %.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm waren zufriedenstellend.

3. Kette IV (Ala^{4}, Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid

Die Hälfte des nach beendeter Synthese von Kette III abgelegten Peptidharzes wurde, nachdem eine positive Aminosäureanalyse vorlag, zur Synthese der Kette IV verwendet. Die Kupplung von Ala mit DCCI an dieses Harz führte zu der gewünschten Kette.

Das aus dieser Kette gewonnene Hybridinsulin erbrachte im Mäusefalltest eine Primäraktivität von 5,5 %.
Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und Elektropherogramm waren zufriedenstellend.

4. Kette V (Ala^4, Ala^9, Ala^{10}, Lys^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid

1 g N $^{\alpha}$-Z-t-BOC-L-Lys-Harz (= mittlere Beladung von 0,29 mMol N $^{\alpha}$-Z-t-BOC-L-Lys/g Harz) wurden in ein Reaktionsgefäß eingewogen. Nach der DCCI-Methode wurden nacheinander folgende Aminosäuren ankondensiert:
Tyr, Phe, Phe, Gly, Arg, Glu, Gly, Cys, Val, Leu, Tyr, Leu, Ala, Glu, Val, Leu, His, Ala, Gly, Cys, Leu, His und Ala.
Die Ausbeute an teilgeschützter Kette betrug, bezogen auf die erste Aminosäure, 60 %. Diese relativ schlechte Ausbeute muß dem Lysin zugeschrieben werden, das als erste Aminosäure mit dem Trägerharz verestert war. Um welchen Effekt es sich jedoch dabei handelte, konnte nicht festgestellt werden.
Das aus der Kette erhaltene Hybridinsulin zeigte im biologischen Test eine Primäraktivität von 5,5 %.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm erbrachten befriedigende Ergebnisse.

5. Kette VI (Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(5-27)-tricosipeptid

Die Hälfte des bei der Synthese von Kette III weggelegten Peptidharzes mit dem Teilstück Leu (B7) bis Ala (B27) wurde, nachdem eine positive Aminosäureanalyse vorlag, zur Synthese von Kette VI verwendet.
Es wurden folgende Aminosäuren nach dem DCCI-Verfahren ankondensiert:
Ala, Ala, Gly, Cys, Leu und Ala.
Nach beendeter Synthese wurde das Peptidharz halbiert und nur eine Hälfte zur Abspaltung des Peptids verwendet.

Die Ausbeute an teilgeschätzter Kette betrug 82 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Das durch Kombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette erhaltene Hybridinsulin erbrachte im Mäusefalltest eine Primäraktivität von 2,8 %.
Die Aminosäureanalyse und das Elektropherogramm waren zufriedenstellend.

6. Kette VII (Ala^4, Ala^5, Ala^9, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid

Die andere Hälfte des bei der Synthese von Kette III weggelegten Peptidharzes mit dem Teilstück Leu (B7) bis Ala (B27) wurde, nachdem eine positive Aminosäureanalyse vorlag, zur Synthese von Kette VII verwendet. Es wurden folgende Aminosäuren nach der DCCI-Methode nacheinander ankondensiert:
His, Ala, Gly, Cys, Leu, Ala und Ala.
Die Ausbeute an teilgeschützter Kette betrug 84 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Das aus dieser Kette hergestellte Hybridinsulin zeigte im biologischen Test eine Primäraktivität von 2,6 %.
Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und Elektropherogramm waren befriedigend.

7. Kette VIII (Ala^4, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid

1,5 g N-t-BOC-L-Ala-Harz (= mittlere Beladung von 0,604 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz) wurden in das Reaktionsgefäß eingewogen.
Mit DCCI wurden nacheinander folgende Aminosäuren angekuppelt:
Tyr, Phe, Phe, Gly, Arg, Glu, Gly, Cys, Val, Leu, Tyr, Leu, Ala, Glu, Val, Leu, Ala, Ala, Gly, Cys, Leu, His und Ala.
Diese Kette wurde später noch einmal mit der p-Nitrophenylester-Methode synthetisiert.
Die Ausbeute an teilgeschützter Kette betrug in beiden Fällen ca. 80 %, bezogen auf die erste Aminosäure.

Die Aminosäureanalysen (s. Tab. 1, S. 40) und die Elektropherogramme stimmten überein und waren zufriedenstellend.
Die aus beiden Ketten erhaltenen Hybridinsuline erbrachten im Mäusefalltest eine Aktivität von 5,5 %.

8. Kette IX (Ala^4, Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid

Die Hälfte des bei der Synthese von Kette VI abgelegten Peptidharzes mit der Teilsequenz Ala (B5) bis Ala (B27) wurde durch Ankuppeln von Ala mit DCCI zur Kette IX umgesetzt.
Die Ausbeute an teilgeschützter Kette betrug nach dem Abspalten vom Trägerharz 84 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Das aus dieser Kette hergestellte Hybridinsulin zeigte im biologischen Test eine Primäraktivität von 2,7 %.
Die Aminosäureanalyse und das Elektropherogramm zeigten die für Merrifieldprodukte üblichen Werte, d. h. sie waren zufriedenstellend.

9. Kette X (Ala^4, Ala^9, Ala^{26})B-Kette-(4-26)-tricosipeptid

0,5 g Ala-Harz (≙ mittlere Beladung von 0,201 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz) wurden eingesetzt, und alle der Sequenz dieser Kette entsprechenden Aminosäuren mit DCCI ankondensiert.
Die Ausbeute an teilgeschützter Kette, bezogen auf die erste Aminosäure, betrug nach der Abspaltung vom Trägerharz 80 %.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm zeigten zufriedenstellende Werte.
Das aus dieser Kette gewonnene Hybridinsulin zeigte im Mäusefalltest eine Primäraktivität von 2,5 %.

10. Kette XI (Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{26})B-Kette-(5-26)-dicosipeptid

Diese Kette wurde in einem Ansatz von 0,403 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz synthetisiert und dann das Peptidharz halbiert. Die Ausbeute an teilgeschützter Kette betrug 84 %, bezogen auf die erste Aminosäure.

Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm zeigten gute Werte.
Das aus dieser Kette erhaltene Hybridinsulin erbrachte im biologischen Test eine Primäraktivität von 2, 0 %.

11. Kette XII (Ala^6, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{26})B-Kette-heneicosipeptid

Das bei der Synthese der Kette XI abgelegte Peptidharz mit dem Teilstück Ala (B6) bis Ala (B26) stellte bereits die gewünschte Kette XII dar.
Nach dem Abspalten vom Trägerharz ergab sich eine Ausbeute an teilgeschütztem Peptid von 83 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm entsprachen den Erwartungen.
Das aus dieser Kette dargestellte Hybridinsulin zeigte im biologischen Test eine Aktivität von 1, 5 %.

12. Kette XIII (Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{25})B-Kette-(5-25)-heneicosipeptid

Diese Kette wurde in einem Ansatz von 0, 403 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz synthetisiert. Nach Erreichen des Ala (B6) wurde die Hälfte des Peptidharzes weggelegt, da dieses Teilstück Ala (B6) bis Ala (B25) bereits die nachfolgende Kette XIV darstellte.
Nach dem Abspalten des Peptids vom Trägerharz wurde eine Ausbeute an teilgeschütztem Peptid von 80 %, bezogen auf die erste Aminosäure, erreicht.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm waren gut. Das aus dieser Kette hergestellte Hybridinsulin zeigte im Mäusefalltest eine Aktivität von 1, 5 %.

13. Kette XIV (Ala^6, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{25})B-Kette-(6-25)-eicosipeptid

Da das bei der Synthese der Kette XIII abgelegte Peptidharz mit dem

Teilstück Ala (B6) bis Ala (B25) bereits die gewünschte Kette darstellte, wurde diese mit 81proz. Ausbeute vom Trägerharz abgespalten. Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm erbrachten zufriedenstellende Ergebnisse.
Das aus dieser Kette gefertigte Hybridinsulin zeigte im biologischen Test eine Aktivität von 1,2 %.

14. Kette XV (Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{24})B-Kette-(6-24)-nonadecapeptid

1 g Ala-Harz (= mittlere Beladung von 0,403 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz) wurden in das Reaktionsgefäß eingewogen. Dann wurden nacheinander die der Sequenz dieser Kette entsprechenden Aminosäuren mit DCCI ankondensiert. Nach beendeter Synthese wurde das Peptidharz halbiert.
Die Kette wurde mit 81proz. Ausbeute, bezogen auf die erste Aminosäure, vom Trägerharz abgespalten.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm zeigten positive Ergebnisse.
Nach Kombination dieser Kette mit nativer Rinderinsulin-A-Kette ergab sich im Mäusefalltest eine Aktivität von 1,0 %.

15. Kette XVI (Ala^{4}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{24})B-Kette-(4-24)-heneicosipeptid

Das bei der Synthese der Kette XV abgelegte Peptidharz mit dem Teilstück Ala (b6) bis Ala (B24) wurde zur Synthese der Kette XVI weiterverwendet. Daran wurden nacheinander His und Ala mit DCCI ankondensiert.
Nach dem Abspalten des teilgeschützten Peptids vom Trägerharz ergab sich eine Ausbeute von 82 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm ergaben zufriedenstellende Ergebnisse.
Das aus dieser Kette dargestellte Hybridinsulin zeigte im biologischen Test eine Aktivität von 1,3 %.

16. Kette XVII (Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{23})B-Kette-(6-23)-octadecapeptid

An 0,5 g Ala-Harz (= mittlere Beladung von 0,201 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz) wurden nacheinander die der Sequenz dieser Kette entsprechenden Aminosäuren mit DCCI ankondensiert.
Nach dem Abspalten der teilgeschützten Kette ergab sich eine Ausbeute von 82 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm zeigten befriedigende Ergebnisse.
Nach Rekombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette erbrachte diese Kette 1,0 % Aktivität im Mäusefalltest.

17. Kette XVIII (Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{22})B-Kette-(6-22)-heptadecapeptid

Diese Kette wurde in einem Ansatz von 0,201 mMol synthetisiert.
Nach dem Abspalten ergab sich eine Ausbeute an teilgeschützter Kette von 85 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Die Aminosäureanalyse und das Elektropherogramm erbrachten gute Ergebnisse.
Das aus dieser Kette erhaltene Hybridinsulin zeigte im Mäusefalltest keine Aktivität

18. Kette XIX (Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(10-27)-octadecapeptid

An 0,5 g Ala-Harz (= mittlere Beladung von 0,201 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz) wurden nacheinander die der Sequenz dieser Kette entsprechenden Aminosäuren mit DCCI angekuppelt.
Nach dem Abspalten der teilgeschützten Kette ergab sich eine Ausbeute von 80 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Die Aminosäureanalyse (s. Tab. 1, S. 40) und das Elektropherogramm zeigten positive Ergebnisse.
Nach Kombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette erbrachte diese Kette 2,0 % Aktivität im biologischen Test.

19. Kette XX (Ala^{18}, Ala^{27})B-Kette-(18-27)-decapeptid

An 0,5 g Ala-Harz (= mittlere Beladung von 0,201 mMol N-t-BOC-L-Ala/g Harz) wurden nacheinander die der Sequenz der Kette entsprechenden Aminosäuren mit DCCI ankondensiert.
Nach dem Abspalten der Kette ergab sich eine Ausbeute an teilgeschütztem Produkt von 84 %, bezogen auf die erste Aminosäure.
Die Aminosäureanalyse und das Elektropherogramm zeigten positive Ergebnisse.
Das aus dieser Kette durch Kombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette erhaltene Hybridinsulin zeigte im Mäusefalltest eine Aktivität von 1,0 %.

b) Reinigung der verkürzten und variierten Insulin-B(SSO_3^-)$_2$-Ketten

1. Auswahl der zu reinigenden B(SSO_3^-)$_2$-Ketten

Aus früheren Arbeiten weiß man, daß die SH-Form der Insulin-B-Kette in Lösung sehr anfällig für Oxydation, Polymerisation und Aggregation ist. Um diese Eigenschaften weitgehend auszuschließen, werden für Arbeiten mit der B-Kette die Bunte-Salze, d.h. die S-Sulfonat-Formen der B-Kette, verwendet.
Für die beabsichtigte Reinigung der synthetischen B-Ketten durch Ionenaustauschchromatographie lagen die Ketten schon als Bunte-Salze vor. Allerdings sind bei den S-Sulfonat-Ketten zwei zusätzliche negative Ladungen zu verzeichnen, welche besonders bei den verkürzten, variierten B-Ketten neue Probleme mit sich bringen.
Betrachtet man die Ketten II bis XX, so stellt man fest, daß alle Ketten zumindest eine positive Ladung weniger haben als die natürliche Insulin-B-Kette.
Die Gesamtladung der synthetisierten B(SSO_3^-)$_2$-Ketten geht von positiv über neutral bis negativ. Aus dieser Tatsache wird ersichtlich, daß nur wenige der synthetisierten Ketten zur Reinigung durch Ionen-

austauschchromatographie in Frage kommen. Aus diesen Ketten war die Vergleichskette (II) als erste zur Reinigung auszuwählen, da alle anderen Aktivitäten auf ihre Primäraktivität bezogen werden.
Als weitere Kette ist diejenige besonders interessant, die trotz maximaler Verkürzung und trotz Variation noch die volle Primäraktivität der Vergleichskette zeigt. Es handelt sich dabei um Kette VIII.
Alle anderen Ketten besitzen zu wenig Ladung oder sind von der Aktivität her gesehen weniger interessant.

Die beiden ausgewählten Ketten ermöglichen die Reinigung an einem sauren Austauscher

2. Reinigung an DOWEX 50 x 2 [36)]

Das Prinzip beruht darauf, daß man die Bunte-Salze an einer Säule von Dowex 50 x 2 (25 cm, ∅ 1 cm) mit folgenden verschiedenen Puffern in 8m Harnstoff stufenweise eluiert:

pH-3, 3-Citratpuffer 0, 2n Na^+ in 8m Harnstoff
pH-4, 3-Citratpuffer 0, 2n Na^+ in 8m Harnstoff
pH-5, 1-Acetatpuffer 0, 3n Na^+ in 8m Harnstoff
pH-7, 5-Acetatpuffer 0, 3n Na^+ in 8m Harnstoff
pH-9, 0-Acetatpuffer 0, 3n Na^+ in 8m Harnstoff

Die Säule wird vorher mit dem Citratpuffer vom pH 3, 3 äquilibriert, dann werden 50 mg $B(SSO_3^-)_2$-Kette (II) in 1 ml Citratpuffer vom pH 2, 2 gelöst auf diese Säule aufgetragen und jeweils mit 100 ml Puffer eluiert. Die UV-Absorption des Eluats wird mit einem Uvicord-Gerät (Typ 8303 A) bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.
Das erhaltene Chromatogramm zeigte nur einen einzigen Peak, der sich im Elektropherogramm als völlig identisch mit der ungereinigten $B(SSO_3^-)_2$-Kette II erwies.
Nach diesem Mißerfolg wurden die Molaritäten der Puffer an Na^+ noch mehr herabgesetzt (0, 1 bzw. 0, 2n Na^+), aber auch diese Maßnahme erbrachte nicht den erwarteten Reinigungseffekt.

3. Reinigung an SE-Sephadex C 25

Eine Arbeit von D. P. ISLAND [37] beschreibt die Trennung von ACTH und MSH mit SE-Sephadex C 25 und einem Pyridin/Essigsäure-Puffersystem. Diese Methode wurde direkt auf die Reinigung der Kette II übertragen, jedoch erbrachte auch die keinen brauchbaren Reinigungseffekt, zumal das Pyridin im verwendeten Wellenbereich (280 nm) erheblich störte. Ein geringer Erfolg ließ sich dem schwachen Molekularsiebeffekt des SE-Sephadex zuschreiben. Aus diesem Grund wurde das SE-Sephadex als Austauscher beibehalten.

Nach vielen theoretischen Überlegungen und praktischen Versuchen stellte sich ein 0, 05m Theorell-Puffer in 8m Harnstoff als das für die Reinigung der Kette geeignete System heraus. Der große Pufferbereich von pH 2 - 12 war eine geradezu ideale Voraussetzung. Für 2 l Stammlösung wurden folgende Substanzmengen eingewogen:
7 g Citronensäure x 1 H_2O (DAB 6)
2 g B_2O_3 (Bortrioxid für Silikatanalyse nach JANNASCH)
4 g 85%ige Phosphorsäure
6, 9 g NaOH-Plätzchen
Das Ganze wurde mit 8m Harnstoff auf 2 l aufgefüllt.
400 ml dieser Stammlösung wurden mit 6n HCl in 8m Harnstoff auf den gewünschten pH gebracht und mit 8m Harnstoff auf 1 l aufgefüllt.

Es wurden Lösungen mit jeweiliger Abstufung von 0, 4 pH-Einheiten zwischen pH 2, 0 bis 9, 0 hergestellt und ausgetestet.
Es empfiehlt sich, den pH der Pufferlösung kurz vor Reinigungsbeginn einzustellen, denn - wie die Erfahrung zeigt - verstellt sich der pH im 8m Harnstoff sehr schnell und deutlich innerhalb sehr kurzer Zeit vom sauren zum basischen Bereich.

Das mit HCl regenerierte SE-Sephadex C 25 wurde über Nacht mit dem Theorellpuffer vom pH 2, 8 äquilibriert. Dann wurden 150 mg $B(SSO_3^-)_2$-Kette II in 8m Harnstoff gelöst aufgetragen. Säulenmaße: l = 20, $\emptyset$ = 1, 8 cm.
Dann wurde mit 200 ml Theorellpuffer vom pH 2, 8 eluiert. Schon in den ersten Gläsern wurde ein Peak mit drei deutlich abgesetzten

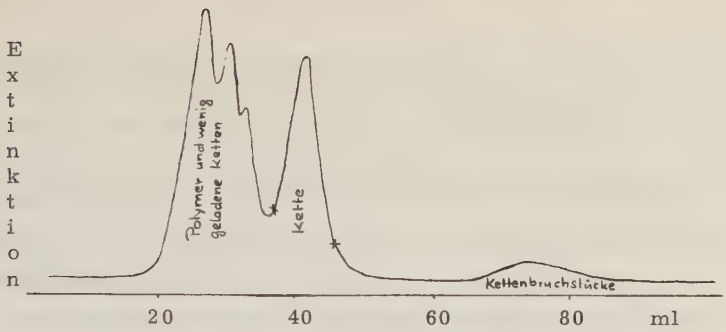
Schultern aufgefangen. Das Elektropherogramm zeigte, daß die dritte Schulter den Hauptfleck der Rohkette darstellte.
Weiterhin wurde daraus deutlich, daß das erhaltene Produkt elektrophoretisch einheitlich und sauber war, was auch von der Aminosäureanalyse bestätigt wurde.
Die Schulter konnte mit dem verwendeten Uvicordgerät gut von dem übrigen Peak abgetrennt werden, wenn man die Elution scharf kontrollierte und die Tropfenzahl bei Erreichen der Schulter schnell änderte.

Das Eluat, das die Schulter enthielt, wurde 6 h gegen eiskaltes, destilliertes Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Da das Entsalzen meist unvollständig war, wurde das Produkt in wenig Ameisensäure gelöst, mit wenig 1n Essigsäure verdünnt und an einer Säule von Sephadex G 50 superfine mit 1n Essigsäure entsalzt.
Nach der Rekombination mit nativer Insulin-A-Kette (Rind) ergab das Hybridinsulin eine Aktivität von 20 - 25 %.
Die Ausbeuten an gereinigter Kette betrugen zwischen 18 und 25 %.

Die Reinigung der Kette VIII erfolgte auf die gleiche Weise, jedoch zeigte das Elutionsdiagramm hier nur zwei deutlich voneinander abgesetzte Schultern. Die zweite Schulter stellte dabei das gereinigte Produkt dar.
Auch diese Kette zeigte ein einwandfreies Elektropherogramm und eine sehr gute Aminosäureanalyse.
Nach Kombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette erbrachte das Hybridinsulin im Mäusefalltest eine Aktivität von 20 - 25 %. Die Ausbeuten betrugen zwischen 15 und 20 %.

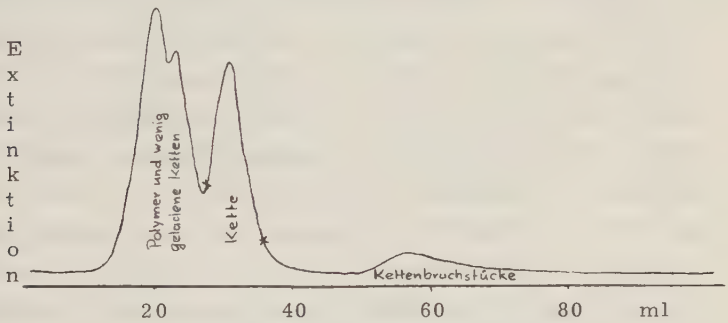
Parallel zu den Kombinationsversuchen wurde zur Kontrolle immer eine Rekombination von nativer A- und B-Kette angesetzt. Die erhaltenen Aktivitäten lagen hier zwischen 40 und 50 %. Das deutet darauf hin, daß die gereinigten Ketten nicht trennbare und Pauly-negative, mit Fehlsequenzen behaftete Kettenreste enthielten, die eine weitere Steigerung der Aktivität verhinderten.

I)



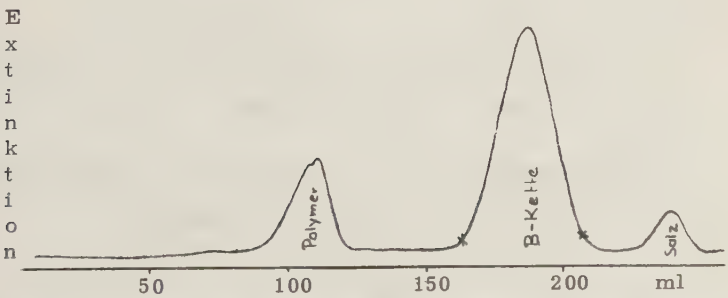
Chromatogramm der Kette II an SE-Sephadex C-25 mit 0, 05m Theorell-Puffer in 8m Harnstoff vom pH 2, 8.

II)



Chromatogramm der Kette VIII an SE-Sephadex C-25 mit 0, 05m Theorell-Puffer in 8m Harnstoff vom pH 2, 8.

III)



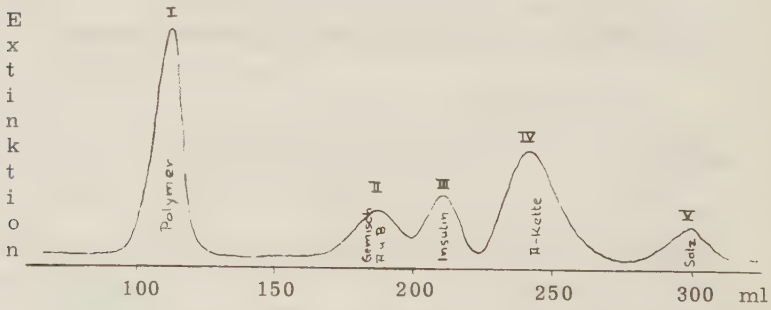
Chromatogramm der gereinigten Ketten bei der Entsalzung an Sephadex G-50 superfine mit 1n Essigsäure (120 cm, ∅ 2 cm)

c) Reinigung der aus den gereinigten B-Ketten dargestellten Hybridinsuline

1. Reinigung der Rohkombinate an Sephadex G-50 superfine

Sechs Kombinationen aus je 20 mg nat. A-Kette und je 5 mg gereinigter, synthetischer B-Kette wurden wie beschrieben kombiniert. Dann stellte man den pH auf 7, 0 ein und dialysierte die Kombinationslösungen 6 h gegen eiskaltes, dest. Wasser.

Nach Zugabe von einigen Tropfen 1-n-Octanol dampfte man i. V. bei 25 °C auf ca. 6 ml ein. Diese Lösung wurde mit Eisessig auf pH 2, 0 gebracht und mit 1n Essigsäure verdünnt. Dann wurde vom ausgefallenen Produkt abzentrifugiert, der Überstand aufgehoben und der Niederschlag mit 8m Harnstoff gelöst. Die Lösung wurde wieder mit Eisessig auf pH 2, 0 eingestellt und nochmals abzentrifugiert. Dies wurde noch dreimal wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden 3 h gegen eiskalte 1n Essigsäure dialysiert, dann mit 1-n-Octanol versetzt und auf 5 ml i. V. bei 25 °C eingeengt. Die zurückbleibende Lösung wurde auf eine Säule (120 cm, ∅ 2 cm) mit Sephadex G-50 superfine (mit 1n Essigsäure äquilibriert) aufgetragen und mit 1n Essigsäure eluiert. Das Elutionsdiagramm zeigte 5 Peaks:



Elutionsdiagramm der beiden Hybridinsuline bei der Reinigung an Sephadex G-50 superfine mit 1n Essigsäure

Der dritte Peak enthielt das Hybridinsulin, das jedoch im Elektropherogramm immer noch zwei Banden zeigte.

Die anderen Peaks enthielten:

Polymer (I), ein Gemisch aus A- und B-Kette (II), reine A-Kette (IV) und schließlich Salz (V).

Das Hybridinsulin aus Peak III zeigte im Mäusefalltest eine Aktivität von 70 - 75 %.

Die Aktivitäten der aus beiden Ketten gewonnenen und gereinigten Hybridinsuline waren identisch.

Die Ausbeuten betrugen in beiden Fällen 2, 4 mg, d.h. 25 % d. Th.

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die in der Einleitung angeführten Arbeiten [1 - 6] eröffneten zwar die Möglichkeit zu einer Kürzung der Insulin-B-Kette ohne sofortigen Aktivitätsverlust, sie sagten jedoch nichts darüber aus, wie weit die Kürzung der B-Kette bei noch erhaltener Aktivität gehen konnte.

Zur Gewinnung eines Überblicks wurde zunächst eine ziemlich drastisch verkürzte B-Kette synthetisiert. Diese starke Verkürzung stützte sich auf die Arbeit von NICOL [5], der trotz Abspaltung des C-terminalen Octapeptids mit Trypsin noch eine Restaktivität von 15 % erhielt, auf die allerdings umstrittenen Befunde von SMITH [7], der mit Leucinaminopeptidase mehrere N-terminale Aminosäuren abbaute und trotzdem noch Insulinaktivität vorfand, sowie auf die Arbeit von WEBER und WEITZEL [4], die beim Fehlen der N-terminalen Aminosäuren B1 und B2 noch volle Aktivität fanden.

Das daraufhin synthetisierte (Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{23})B-Kette-(6-23)-octadecapeptid (XVII) erbrachte nach Überführung in das Hybridinsulin im Mäusekrampftest eine deutliche Restaktivität. Dieses Ergebnis ebnete den Weg für eine systematische Kürzung der Insulin-B-Kette und zeigte gleichzeitig, daß es vielleicht möglich wäre, sie noch stärker zu verkürzen.

Verkürzungen am C-Terminus

Austauschversuche von Lys B29, Pro B28 und Thr B27 gegen L-Alanin hatten gezeigt, daß hierbei kein Aktivitätsverlust eintritt [38]. Außerdem hatte sich der Austausch von Ser B9 gegen L-Alanin schon früher als "stumme" Substitution erwiesen [39]. Aus diesen Gründen wurde das (Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(1-27)-heptacosipeptid (II) synthetisiert. Das daraus gewonnene Hybridinsulin zeigte 5,5 % Primäraktivität im biologischen Test. Diese Kette wurde fortan als Bezugskette für alle anderen gekürzten synthetischen B-Ketten genommen.

Es ist bekannt [40, 41], daß die Behandlung der Insulin-B-Kette mit Natrium in flüssigem Ammoniak zu einer erheblichen Spaltung der

Threonin-Prolin-Bindung (B27/B28) führt. Nach einem Hinweis im Schrifttum [43] soll eine solche B-Kette mit fehlendem C-terminalem Tripeptid (B30-B28) im Insulin die biologische Aktivität nicht herabsetzen. Dies würde mit dem obigen Befund hinsichtlich der Wirksamkeit der 1-27-B-Kette übereinstimmen. Damit dürfte es auch gerechtfertigt sein, die Kette II als Bezugskette für alle weiteren synthetischen, gekürzten B-Ketten zu verwenden.

Andererseits ist aus der Wirksamkeit der 1-27-B-Kette zu schließen, daß die relativ schlechten Aktivitäten der ungekürzten synthetischen B-Ketten [38, 39] nicht der Spaltung der Threonin-Prolin-Bindung (B27/B29) zuzuschreiben sind. Vielleicht liegt bei einer der weggelassenen Aminosäuren besonders geringe Kupplungsfreudigkeit vor, oder es ist die Vermutung richtig, daß der Synthesezyklus bei einer Kette unter dreißig Aminosäuren allgemein günstiger verläuft als bei einer Kette mit dreißig oder mehr Aminosäuren.

Verkürzung am N-Terminus

Nachdem das Carboxylende der B-Kette um ein Tripeptid gekürzt war und dabei die biologische Aktivität nicht merklich abgenommen hatte, legte es die hier angewandte Merrifield-Synthesetechnik nahe, nunmehr eine Verkürzung des Aminoendes der B-Kette zu versuchen.
Wie bereits erwähnt (s. l.c. [39]), sind die N-terminalen Positionen Phe B1 und Val B2 für die biologische Aktivität nicht essentiell. (Hinsichtlich Phe B1 wurde diese Tatsache inzwischen auch von BRANDENBURG [42] mit einer anderen Methode bestätigt.) Darüber hinaus wurde festgestellt [39], daß Asn B3 und Gln B4 ohne Wirkungsverlust durch L-Alanin ersetzt werden können.

Eine Synthese des (Ala^9, Ala^{27})B-Kette-(5-27)-tricosipeptids bot sich an. Diese Kette (III) zeigte nach Überführung in das Hybridinsulin einen starken Aktivitätsabfall auf 0,4 %.
In dieser Kette fehlen die Aminosäuren B1 - B4, so daß Histidin B5 aminoendständig ist. Damit liegt Histidin in der sog. "Histaminstruktur" vor, so daß das Aminoende der Kette III mit demjenigen des antagonistisch wirksamen Glucagons übereinstimmt. Es ist sicher, daß

aminoendständiges Histidin einer Peptidkette spezielle Eigenschaften verleiht, z. B. hinsichtlich der Metallaffinität [44]. Aminoendständiges Histidin verhält sich daher anders als Histidin innerhalb der Peptidkette.
Aus dieser Überlegung heraus wurde das (Ala^4, Ala^9, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid (IV) synthetisiert. Es handelt sich hier also um eine B-Kette, die am N-Terminus vor His B5 noch Ala in B4 besitzt. Diese Variation hatte zur Folge, daß das daraus gewonnene Hybridinsulin im Mäusefalltest wieder die gewohnte Aktivität von 5, 5 % erbrachte.

Um festzustellen, ob nur die "Histaminstruktur" des in Kette III aminoendständigen Histidinrestes B5 zu dem erwähnten starken Wirkungsverlust geführt hatte, wurde das (Ala^4, Ala^5, Ala^9, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid (VII) synthetisiert. Die Aktivitätsprüfung im biologischen Test ergab 2, 6 %. Daraus geht hervor, daß

1. die Histaminstruktur des N-terminalen His B5 in Kette III die Schuld am starken Absinken der Aktivität trug, und daß
2. His B5 nicht ohne Aktivitätsverlust durch L-Alanin ersetzt werden kann.

Die Frage drängte sich hier auf, wie stark die Wirksamkeit der B-Kette abnimmt, wenn außer His B5 auch noch His B10 durch L-Alanin ersetzt wird. Die Synthese des (Ala^4, Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptids (IX) sollte diese Frage beantworten. Das Ergebnis war erstaunlich. Das aus dieser Kette IX dargestellte Hybridinsulin zeigte mit 2, 7 % keine weitere Aktivitätsverminderung gegenüber der Kette VII. Das aber bedeutet, daß His B10 nicht essentiell ist, dagegen scheint His B5 zumindest "halbessentiell" zu sein.

Um dieses Ergebnis zu sichern, wurde Histidin B5 wieder in die Kette hereingenommen und das (Ala^4, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid (VIII) synthetisiert. Nach Überführung in das Hybridinsulin zeigte dieses Kette tatsächlich wieder die Aktivität der Vergleichskette von 5, 5 %.

Will man nach diesen Ergebnissen urteilen, so müßte eine Weiterführung der Kürzung am N-Terminus, die zu dem (Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27})

B-Kette-(5-27)-tricosipeptid (VI) führen würde, eine Primäraktivität von 2, 5 - 2, 7 % erwarten lassen. Das aus dieser Kette VI gewonnene Hybridinsulin bestätigte mit 2, 8 % diese Vermutung.

Weitere Verkürzung am C-Terminus

Damit war am N-Terminus der Punkt erreicht, an dem die Kürzung zu einem merklichen Aktivitätsverlust führt. Daher wurden die Verkürzungsversuche jetzt am C-Terminus weitergeführt.
Zunächst stellte sich die Frage, ob ein eventueller Austausch des bisher carboxylendständigen L-Alanins durch eine andere Aminosäure schon einen Aktivitätsverlust nach sich ziehen würde. Die Wahl für dieses Experiment fiel auf das trifunktionelle L-Lysin.
Das Hybridinsulin aus dem (Ala^4, Ala^9, Ala^{10}, Lys^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid (V) zeigte mit 5, 5 % Aktivität keinen Wirkungsverlust gegenüber der Vergleichskette (II).

Da L-Threonin B27 als C-terminale Aminosäure laut Schrifttum [43] ebenfalls keinen Aktivitätsverlust bewirken soll, wurden weitere Variationen an diesem Punkt der B-Kette unterlassen. Der Schluß liegt nahe, daß wahrscheinlich nur die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure für die biologische Wirkung notwendig ist.

Um das Kürzungsproblem weiter zu klären, wurde das Hybridinsulin getestet, das aus dem (Ala^4, Ala^9, Ala^{26})B-Kette-(4-26)-tricosipeptid (X) erhalten wurde. Die gefundene Aktivität von 2, 5 % im biologischen Test spricht dafür, daß Tyrosin B26 ähnlich wie Histidin B5 für die biologische Wirkung des Insulins zumindest "halbessentiell" ist, zumal ein Ersatz von Tyrosin B26 durch L-Alanin sich an der ungekürzten B-Kette ebenfalls als aktivitätsmindernd erwiesen hatte [45].

Die bisher erhaltenen Ergebnisse stellen also das (Ala^4, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid (IV) als diejenige B-Kette heraus, die trotz beidseitiger Verkürzung und Variation in den Positionen B4, B9, B10 und B27 noch die volle Aktivität der Vergleichskette (II) aufweist. Jede weitere Verkürzung zieht eine merkliche Aktivitätsverminderung nach sich.

Das Tyrosinproblem

Was nun die Tyrosinreste im Insulinmolekül anbetrifft, so wurden darüber sehr viele Arbeiten mit widersprüchlichen Ergebnissen publiziert [46 - 53].

BISCHOFF und SAHYUN [46] behandelten Insulin mit H_2SO_4 bei - 5 °C - + 5 °C und erhielten ein Produkt, das noch die halbe Aktivität des Rinderinsulins im biologischen Test zeigte. Ein ähnliches Ergebnis erhielten GLENDING, GRUNDBERG und FRAENKEL-CONRAT [47] mit derselben Methode achtzehn Jahre später. Zwischen diesen beiden Arbeiten liegt diejenige von STERN und WHITE [48], die durch Behandlung von Insulin mit Keten eine Acetylierung der Tyrosinreste erreichen wollten. Die biologische Aktivität dieses Produktes war nur noch sehr gering. CORY et al. [49] erhielten durch Jodierung des Insulins ebenfalls ein Produkt, das im biologischen Test nur noch geringe Restaktivität erbrachte. Auch eine Arbeit von KERTESZ [50] über die Oxidation der Tyrosinreste im Insulin mit Tyrosinase deutete auf die Wichtigkeit der Tyrosinreste hin.

Der biologische Test ergab auch bei diesem Produkt nur noch geringe Restaktivität. SIZER et al. [51], die auch Versuche am Insulin mit Tyrosinase machten, weisen jedoch in ihrer Arbeit darauf hin, daß Tyrosinase eventuell auch Amino-, Sulfhydryl- und andere Gruppen angreift. Einen ähnlichen Einwand kann man auch für die anderen Arbeiten geltend machen. Sowohl bei Additionsreaktionen als auch bei der schon oft am Insulin angewandten Photooxydation [52 - 54] müssen außer der gewünschten Reaktion stets Nebenreaktionen angenommen werden, an denen z. B. die Disulfidbrücken beteiligt sind.

WEITZEL et al. [55] und KÖHLER [56] konnten an der Insulin-A-Kette beweisen, daß zumindest die phenolischen Hydroxylgruppen der Tyrosinreste in A14 und A19 für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentiell sind. Eine persönliche Mitteilung von J. MARTIN besagt, daß auch der Tyrosinrest B 16 in der B-Kette ohne Wirkungsverlust durch L-Alanin ersetzt werden kann, der gleiche Hinweis findet sich bei ZOLLNER [45]. Somit ergab sich aus den in unserem Arbeitskreis dargestellten Insulin-Analogen, daß nur noch dem Tyrosin B26 die hohe

Bedeutung zukommen konnte, die in den Arbeiten von STERN [48], KERTESZ [50] und CORY [49] allgemein den Tyrosinresten im Insulin zugeschrieben wird. Eine persönliche Mitteilung von H. ZOLLNER, der nach Austausch von Tyrosin B26 gegen L-Phenylalanin im biologischen Test nur noch eine geringe Restaktivität erhielt, schien diese Vermutung zu erhärten.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit bringen angesichts des Für und Wider der Literaturergebnisse eine Klärung des "Tyrosinproblems". Wie schon oben beschrieben, zeigte sich, daß zwar ein Tyrosinrest (B26) von vier für die Hormonaktivität wichtig ist, er ist jedoch nicht hochessentiell. Ähnlich wie Histidin B5 könnte man ihn als "halbessentiell" bezeichnen.

Wirkungsverlust bei Fortführung der B-Kettenkürzung

Es lag nahe, die Kürzungen der halbaktiven Ketten VI und X in einer einzigen Kette zu vereinigen, um bei einem eventuellen linearen Absinken der Aktivität sofort zum absoluten Wirkungsverlust zu kommen. Das (Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{26})B-Kette-(5-26)-dicosipeptid (XI) wurde synthetisiert. Das daraus erhaltene Hybridinsulin zeigte zwar im Mäusekrampftest ein weiteres Absinken der Aktivität auf 2,0 %, jedoch ist daraus zu ersehen, daß keinesfalls mit einem linearen Abfall der biologischen Aktivität bei derartigen Kürzungen zu rechnen ist.

Das Weglassen einer weiteren Aminosäure am N-Terminus führte zu dem (Ala^6, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{26})B-Kette-(6-26)-heneicosipeptid (XII), das nach Überführung in das Hybridinsulin eine Aktivität von 1,5 % erbrachte. Offensichtlich ist der Ersatz von Leucin B6 durch L-Alanin oder die Verkürzung der B-Kette am Aminoende um eine Aminosäure mit einem weiteren Wirkungsverlust verbunden. Es dürfte also Leucin B6 eine gewisse Bedeutung im Insulinmolekül zukommen.

Das (Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{25})B-Kette-(5-25)-heneicosipeptid (XIII) hatte gegenüber der Kette XI ein um eine Aminosäure verkürztes Carboxylende und zeigte als Hybridinsulin im Mäusekrampftest eine Aktivität von 1,5 %. Dies bedeutet, daß auch dem Phenylalaninrest

B25 eine gewisse Bedeutung für die Aktivität des Hormons beizumessen ist.

Die Vereinigung der letzten beiden Kürzungen (in den Ketten XII und XIII) in dem (Ala^6, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{25})B-Kette-(6-25)-eicosipeptid (XIV) erbrachte im biologischen Test einen weiteren Aktivitätsabfall auf 1,2 %.

Die Kürzung des C-Terminus um eine weitere Aminosäure führte zur Synthese des (Ala^6, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{24})B-Kette-(6-24)-nonadecapeptids (XV), das nach Kombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette eine weitere Aktivitätsverminderung auf 1,0 % erbrachte. Wahrscheinlich ist also auch der Phenylalaninrest B24 in der Insulin-B-Kette nicht ohne Bedeutung.

Um zu sehen, inwiefern sich eine Verlängerung der obigen B-Kette XV am N-Terminus auf die Aktivität auswirkt, wurde das (Ala^4, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{24})B-Kette-(4-24)-heneicosipeptid (XVI) synthetisiert.
Eine nur geringe Zunahme der Aktivität auf 1,3 % verdeutlichte noch einmal die bereits beschriebene Wichtigkeit der drei Aromaten Phe B24, Phe B25 und Tyr B26 am Carboxylende der Insulin-B-Kette.

Die Synthese des eingangs beschriebenen (Ala^6, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{23})B-Kette-(6-23)-octadecapeptids (XVII) führte zu keinem weiteren Aktivitätsverlust. Mit seinen 1,0 % Aktivität im biologischen Test ließ dieses Produkt jedoch noch nicht erkennen, daß beim Verlust einer weiteren C-terminalen Aminosäure im (Ala^6, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{22})B-Kette-(6-22)-heptadecapeptid (XVIII) der Punkt erreicht war, an dem die Aktivität Null beträgt. Dieses plötzliche Absinken der Aktivität auf Null konnte nur dem Fehlen des Arginins B22 zugeschrieben werden, denn nach NICOL [5] enthielt das (Phe^1, Arg^{22})B-Kette-(1-22)-dicosipeptid immerhin noch eine Restaktivität von 15 %. Die Wichtigkeit des Arginins B22 für die biologische Wirkung des Insulins dürfte somit auf der Hand liegen, denn es kann nicht durch L-Alanin ersetzt werden, wie Kette XVIII zeigt.

So interessant dieses Ergebnis für die Wichtigkeit des Arginin B22 in der B-Kette auch immer sein mochte, für den Synthetiker war es ein betrüblicher Befund. (Der Biochemiker, das soll hier deutlich

unterstrichen werden, weiß diesen Befund hoch zu schätzen.) Arginin wurde, wie schon oben beschrieben, als N^G-Tos-N^α-t-BOC-L-Arginin bei der Synthese eingesetzt. Dies hatte jedoch den großen Nachteil, daß die Kette nach dem Abspalten vom Merrifieldharz mit TFA/HBr noch zum Entfernen des Tosylrestes mit Natrium in flüssigem Ammoniak behandelt werden mußte.

Inzwischen hatte jedoch WEBER [57] einen neuen SH-Schutz in der S-Äthylmercapto-Schutzgruppe gefunden und bei der Synthese einer Insulin-A-Kette erfolgreich eingesetzt. Diese Schwefelschutzgruppe hatte den großen Vorteil, daß sie ohne weiteres durch einfache Sulfitolyse wieder abgespalten werden kann, jedoch unter Synthesebedingungen stabil ist. Es wäre deshalb von großem Vorteil gewesen, wenn man diesen Schwefelschutz auch bei der B-Kettensynthese verwenden und somit die Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak hätte umgehen können. Leider machte der Tosylschutz des Arginins es unmöglich, argininhaltige B-Ketten mit S-Äthyl-mercapto-L-Cystein zu synthetisieren. Wäre nun das L-Arginin B22 für die B-Kette als nicht essentiell befunden worden, dann wäre damit die Möglichkeit zur Synthese einer B-Kette mit S-Äthyl-mercapto-L-Cystein gegeben gewesen.

Eine andere Möglichkeit, den neuen Schwefelschutz doch noch verwenden zu können, lag darin, ein Argininderivat zu finden, das unter Synthesebedingungen stabil blieb, dessen Guanidoschutz jedoch beim Abspalten des Peptids vom Merrifield-Harz mit TFA/HBr abgelöst wurde. Leider war die Suche nach einem derartigen Argininderivat erfolglos.

Kürzungsversuche am N-Terminus zur Erreichung des absoluten Wirkungsverlustes (unter Beibehaltung des C-Terminus der Vergleichskette II)

Die Vermutung lag nahe, daß die Nullaktivität dann zu erreichen wäre, wenn man eine N-terminale Kürzung über den Cysteinrest B7 hinaus vornimmt. Deshalb wurde das (Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(10-27)-octadecapeptid (XIX) synthetisiert. Etwas überraschend war festzustel-

len, daß das daraus gewonnene Hybridinsulin eine Aktivität von 2,0 % im Mäusekrampftest erbrachte. Damit lag praktisch fest, daß das Cystein B7 und somit auch die daraus resultierende Disulfidbrücke für die Insulinwirkung nicht essentiell ist.

Hinweise darauf, daß ein Cysteinrest, d.h. eine Disulfidbrücke im Insulinmolekül für dessen Wirkung nicht essentiell ist, finden sich in einer Arbeit von GATTNER [58]. Das obige Ergebnis präzisiert diese Befunde in soweit, als es genau bezeichnet, um welche der drei Disulfidbrücken es sich dabei handelt. Eine Bestätigung erhielt dieser Befund durch eine persönliche Mitteilung von S. HÖRNLE, der bei der Insulin-A-Kette durch Austausch von Cystein A7 gegen L-Alanin keine Aktivitätsverminderung erhielt.

Eine sehr drastische Kürzung am N-Terminus sollte endlich zur Aktivität 0 % führen. Das (Ala^{18}, Ala^{27})B-Kette-(18-27)-decapeptid (XX) ergab nach der Rekombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette im biologischen Test jedoch noch immer eine Aktivität von 1,0 %.
Eine Kürzung über Cystein B19 hinaus wäre sinnlos, da ja dann keine Kombination mit der A-Kette mehr durchgeführt werden könnte. Die Inaktivität der getrennten A- und B-Ketten ist aber schon lange erwiesen. Daraus folgt aber, daß ein absoluter Wirkungsverlust durch Kürzung des N-Terminus der B-Kette unter Beibehaltung des C-Terminus der Vergleichskette II und unter Wahrung der Kombinationsmöglichkeit mit der A-Kette nicht zu erreichen ist.

Schlußfolgerungen

Betrachtet man die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung des Insulins, so ergibt sich, daß am Carboxylende der Insulin-B-Kette die Zahl der Aminosäuren, die für die Hormonaktivität wichtig sind, größer ist als am Aminoende. Man denke dabei an Tyrosin B26, Phenylalanin B25, Phenylalanin B24, Arginin B22 und Cystein B19, am Aminoende kann lediglich Histidin B5 als wichtig angesehen werden.
Wirkungszentren, falls es sie überhaupt im klassischen Sinne gibt, müßten hauptsächlich zwischen B26 und B19 (je einschließlich) gesucht werden.

Auch ein eventueller Wirkungsmechanismus kann ohne diese Aminosäurereste nicht entwickelt werden. Selbst Histidin B5 darf bei der Klärung des Wirkungsmechanismus nicht unberücksichtigt bleiben, jedoch muß seine Funktion im Insulinmolekül eine andere sein als in manchen Enzymen (z. B. im Trypsin, Chymotrypsin usw.), denn es wurde nur als "halbessentiell" befunden (s. o.).

Das Reinigungsproblem

Die aus den obigen Ergebnissen gezogenen Schlüsse sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, bis es gelingt, zumindest eine der mit einer Primäraktivität von 5, 5 % als voll wirksam bezeichneten Ketten so zu reinigen, daß das daraus gewonnene Hybridinsulin durch weitere Reinigung auf die volle Aktivität von 100 % gebracht werden kann.

Als erste Kette wurde das (Ala^{9}, Ala^{27})B-Kette-(1-27)-heptacosipeptid (II) zur Reinigung ausgewählt. Als zweite Kette kam das (Ala^{4}, Ala^{10}, Ala^{27})B-Kette-(4-27)-tetracosipeptid (VIII) in Betracht, und zwar deshalb, weil es sich hier um diejenige Kette handelt, die trotz maximaler Verkürzung und Variation noch die volle Aktivität der Vergleichskette (II) von 5, 5 % im biologischen Test erbringt.

Da aus den Elektropherogrammen der beiden Ketten zu ersehen war, daß sie noch genügend positive Ladungen hatte, wurde zunächst eine Reinigung nach NIU et al. [33] durch Ionenaustauschchromatographie mit Dowex 50 x 2 versucht, jedoch war mit dieser Methode, besonders bei Kette VIII, kaum ein Reinigungseffekt zu erreichen.

Als Ionenaustauscher mit Molekularsiebeffekt bot sich SE-Sephadex C-25 an. Es wurden zunächst verschiedene Puffersysteme untersucht, die für die Reinigung der gekürzten B-Ketten in Betracht kamen. Als geeigneter Puffer erwies sich der schon beschriebene 0, 05m Theorellpuffer in 8m Harnstoff. Mit diesem System (SE-Sephadex und Theorellpuffer) gelang die Reinigung der beiden ausgewählten Ketten so gut, daß sich ein elektrophoretisch einheitliches Produkt von jeder der beiden B-Ketten isolieren ließ. Auch die Aminosäureanalysen erbrachten dementsprechend gute Werte.

Die Rekombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette erbrachte im Mäusekrampftest eine Aktivität von 20 - 25 %. Die Ausbeute an gereinigter Kette betrug in beiden Fällen zwischen 15 und 20 %.
Der Kettenreinigung schloß sich die Reinigung des aus der jeweils gereinigten B-Kette erhaltenen Hybridinsulins an. Diese Reinigung erfolgte, wie schon beschrieben, durch Gelfiltration an Sephadex G-50 superfine mit 1n Essigsäure. Das so erhaltene Hybridinsulin zeigte im Mäusefalltest eine Aktivität von 70 - 75 %. Unterschiede in den Aktivitäten der beiden gereinigten Ketten und der daraus erhaltenen gereinigten Hybridinsuline konnten nicht festgestellt werden, jedoch waren beide Hybridinsuline noch nicht elektrophoretisch rein.

Die Steigerung der Aktivitäten durch Reinigung der beschriebenen Ketten sowie der daraus gewonnenen Hybridinsuline auf 75 % dürfte somit die oben gezogenen Schlüsse gut unterstützen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

19 verkürzte und sequenzvariierte Insulin-B-Ketten wurden durch Festkörpersynthese nach Merrifield hergestellt und durch Kombination mit nativer Rinderinsulin-A-Kette in die Hybridinsuline übergeführt.

Die Aktivitätsbestimmungen im Mäusefalltest ergaben, daß die Insulin-B-Kette ohne Wirkungsverlust an beiden Enden erheblich verkürzt und variiert werden kann, und daß selbst eine drastische Kürzung der B-Kette vom Aminoende und vom Carboxylende her zum Teil noch beachtliche Restaktivitäten erbringt.

Geht die Kürzung vom Carboxylende her über Arginin B22 hinaus, so tritt vollständiger Wirkungsverlust ein. Auch ein Ersatz von Arginin B22 durch L-Alanin führt nicht zur Rückgewinnung der biologischen Aktivität.
Wird die B-Kette vom Aminoende her um 10 Aminosäuren verkürzt, so ist damit noch nicht die volle Inaktivität zu erreichen.

Die Aminosäurereste Histidin B5, Arginin B22 und Tyrosin B26 sind für die Insulinaktivität von Bedeutung, nicht aber die bisher als essentiell betrachteten Aminosäurereste Cystein B7 und Histidin B10.

Durch die Reinigung der Ketten und der daraus gewonnenen Hybridinsuline gelang es, die biologische Aktivität der letzteren bis auf 75 % zu steigern (Rinderinsulin = 100 %).

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1) U. Weber, F. Schneider, P. Köhler, G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 2945 (1967)

2) J.I. Harris, C.J. Li
J. Amer. chem. Soc. 74, 2945 (1952)

3) F.H. Carpenter
Amer. J. Med. 40, 750 (1966)

4) U. Weber, G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1431 (1968)

5) D.S.H.W. Nicol
Biochem. J. 75, 395 (1960)

6) F.H. Carpenter, L.I. Slobin
Biochemistry (Washington) 5, 499 (1966)

7) E.L. Smith, R.L. Hill, A. Borman
Biochim. biophys. Acta 29, 207 (1958)

8) L.A. Caprino, C.A. Giza, B.A. Caprino
J. Amer. chem. Soc. 81, 955 (1959)

9) E. Schnabel
Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)

10) L. Zervas, M. Winitz, J.P. Greenstein
J. org. Chem. 22, 1515 (1957)

11) J. Rachmandrian, C.H. Li
J. org. Chem. 27, 4008 (1962)

12) E. Schnabel
Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)

13) E. Schröder
Liebigs Ann. Chem. 673, 208 (1964)

14) E. Sandrin
Helv. chim. Acta 46, 1637 (1963)

15) C.R. Harington, T.H. Mead
Biochem. J. 30, 1598 (1936)

16) Organic Synthesis
Vol. XIII, S. 86

17) L.D. Small, J.H. Bailey, C.J. Cavallito
J. Amer. chem. Soc. 69, 1711 (1947)

18) S. Yurugi
J. pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi) 74, 513 (1954)

19) U. Weber
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1421 (1969)

20) M. Bergmann, L. Zervas
Chem. Berg. 65, 1192 (1932)

21) H. Zahn, W. Danho, B. Gutte
Z. Naturforsch. 21b, 763 (1966)

22) V. Du Vigneaud, O.K. Berens
J. biol. Chem. 117, 27 (1937)

23) A. Neuberger, F. Sanger
Biochem. J. 37, 515 (1943)

24) E. Wünsch, G. Fries, A. Zwick
Chem. Ber. 91, 542 (1958)

25) H. Zahn, W. Danho, B. Gutte
Z. Naturforsch. 21b, 763 (1966)

26) K.W. Pepper, H.M. Paisley, M.A. Young
J. chem. Soc. (London) 4097 (1953)

27) R.B. Merrifield
Biochemistry (Washington) 3, 1385 (1964)

28) S. Hörnle
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1355 (1967)

29) R.B. Merrifield
J. Amer. chem. Soc. 85, 2149 (1963)

30) Y.C. Du et al.
Scientia sinica 10, 84 (1961) und 15, 231 (1966)

31) G.M. Dixon, A.C. Wardlaw
Nature (London) 188, 721 (1960)

32) Y.C. Du, C.I. Niu
Scientia sinica 14, 1386 (1965)

33) C.I. Niu, Y.C. Du
Scientia sinica 15, 231 (1966)

34) H. Zahn, E. Drechsel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 371 (1968)

35) U. Weber, G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1431 (1968)

36) T. Okuda, H. Zahn
Makromolekul. Chem. 121, 87 (1969)

37) D.P. Island
J. clin. Endocrinol. Metab. 25, 975 (1965)

38) G. Weitzel, K. Eisele, H. Zollner, U. Weber
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1480 (1969)

39) U. Weber, G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1431 (1968)

40) A. Marglin, R.B. Merrifield
J. Amer. chem. Soc. 85, 5051 (1966)

41) W.F. Benisek, R.D. Cole
Biochem. biophys. Res. Commun. 20, 655 (1965)

42) D. Brandenburg
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 741 (1969)

43) P.G. Katsoyannis
Annu. Rev. Biochem. 38, 905 (1969)

44) G. Weitzel, E. Buddecke, D. Kraft
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 305, 132 (1956)

45) H. Zollner
Dissertation Tübingen (1969)

46) F. Bischoff, M. Sahyun
J. Biol. Chem. 81, 167 (1929)

47) M. Glending, D. Grundberg, H. Fraenkel-Conrat
J. Biol. Chem. 167, 125 (1947)

48) K. Stern, A. White
J. Biol. Chem. 122, 371 (1938)

49) U. Cory, C. Bigelow, E. Frieden
Biochemistry 1, 419 (1962)

50) D. Kertesz
Nature 165, 523 (1950)

51) I. Sizer, C. Brindley
J. Biol. Chem. 185, 323 (1950)

52) G. Weitzel, W. Schaeg, G. Boden, B. Willms
Z. Naturforsch. 20b, 497 (1965)

53) G. Weitzel, W. Schaeg, G. Boden, B. Willms
Liebigs Ann. Chem. 689, 248 (1965)

54) L. Weil, T.S. Seibles, T.T. Herkovits
Arch. Biochem. Biophys. 111, 308 (1965)

55) U. Weber, S. Hörnle, G. Grieser, K.H. Herzog, G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1715 (1967)

56) P. Köhler
Dissertation Tübingen (1969)

57) U. Weber
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1421 (1969)

58) H. Zahn, persönl. Mitteilung
Deutsches Wollforschungsinstitut Aachen

LEBENSLAUF

Am 7. November 1940 wurde ich in Stuttgart als Sohn der Maurerseheleute Karl Eisele und Johanna Eisele geb. Lutz geboren.

Im Herbst 1947 trat ich in die Volksschule Plattenhardt ein, ab Frühjahr 1952 besuchte ich das Wilhelmsgymnasium in Stuttgart, wo ich das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich das Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Im April 1964 legte ich den ersten Teil zum Vordiplom für Biochemie ab. Dem folgte im Juni 1966 der erfolgreiche Abschluß des zweiten Teils zum Vordiplom für Biochemie.
Das Diplom legte ich im Sommer 1968 ab. Das Thema der Diplomarbeit lautete: "Synthese einer variierten Insulin-A-Kette und eines entsprechenden Teilpeptids" (Klassische Methode). Die Arbeit wurde unter der Leitung von Professor Dr. Dr. G. Weitzel im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Im Sommer 1968 begann ich mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation. Das Thema lautete: "Synthese und biologische Aktivität verkürzter, variierter Insulin-B-Ketten"(Merrifield-Methode).
Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Professor Dr. Dr. G. Weitzel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Die Arbeit wurde im Sommer 1970 abgeschlossen.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, F. Schneider
Anorganische Chemie	W. Rüdorff
Organische Chemie	E. Müller, E. Bayer
Physikalische Chemie	H. Mauser.

Physik	H. Krüger
Mathematik	W. Schweizer
Anatomie	K. Mörike
Botanik	E. Bünning, H. Metzner
Zoologie	K.G. Grell, F.P. Möhres
Mikrobiologie	F. Lingens, H. Zähner
Pharmakologie	F. Lembeck

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen